

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-511792

(P2002-511792A)

(43) 公表日 平成14年4月16日 (2002. 4. 16)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
B 0 5 B 5/025		B 0 5 B 5/025	Z
12/00		12/00	Z
B 0 5 D 1/04		B 0 5 D 1/04	H
5/12		5/12	B
C 0 7 B 61/00	Z C C	C 0 7 B 61/00	Z C C A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全104頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-504841
(86) (22) 出願日 平成10年6月19日 (1998. 6. 19)
(85) 翻訳文提出日 平成11年12月20日 (1999. 12. 20)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 8 / 1 2 7 6 8
(87) 国際公開番号 W O 9 8 / 5 8 7 4 5
(87) 国際公開日 平成10年12月30日 (1998. 12. 30)
(31) 優先権主張番号 6 0 / 0 5 0 , 2 7 4
(32) 優先日 平成9年6月20日 (1997. 6. 20)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)
(31) 優先権主張番号 6 0 / 0 5 5 , 2 8 7
(32) 優先日 平成9年8月13日 (1997. 8. 13)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ニューヨーク ユニヴァーシティ
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10012
ニューヨーク ワシントン スクエア
サウス 70
(72) 発明者 モロゾフ ヴィクター エヌ
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10003
ニューヨーク ワシントン プレイス
14 アパートメント 3ケイ
(72) 発明者 モロゾヴァ タマラ ヤ
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10003
ニューヨーク ワシントン プレイス
14 アパートメント 3ケイ
(74) 代理人 弁理士 杉村 暁秀 (外2名)

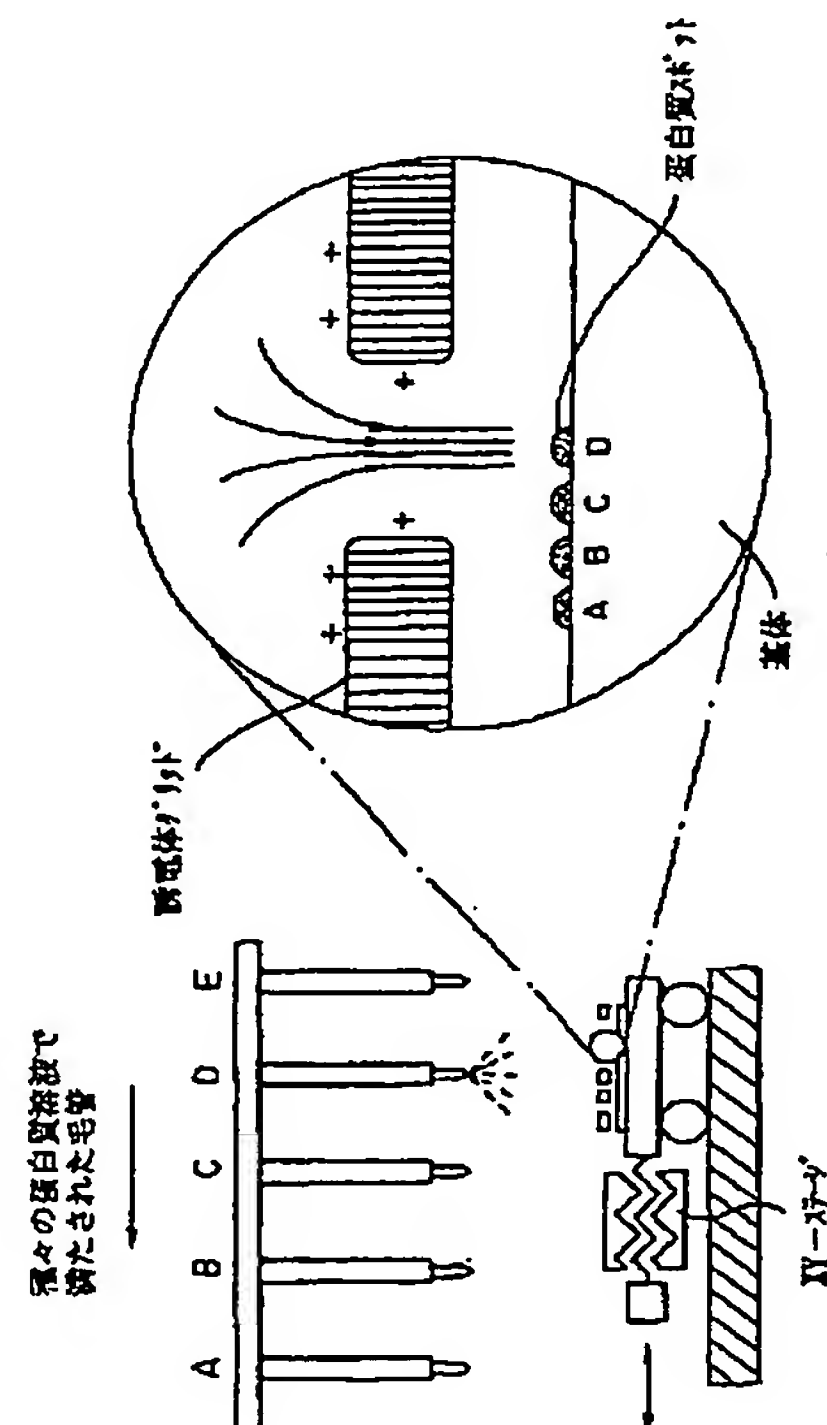
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 チップ及びライブラリの大量製造における物質溶液の静電噴霧

(57) 【要約】

基体表面上にスポットまたはフィルムの形態として、巨大生体分子を含む不揮発性物質の堆積物を、静電噴霧によって製造する方法であって、この堆積物は、不揮発性物質の堆積物の他の物質への相互作用を測定するために使用される。この方法は、単一の配列における単一チップ及び複数成分の微小試料の大量製造をも含むものである。

FIG. 9



BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

1. 生物学的機能および／または生物学的活性を有する不揮発性物質の堆積物を基体上に製造する方法であって、生物学的機能および／または生物学的活性な物質の溶液を静電噴霧させて、生物学的機能および／または生物学的活性を有する不揮発性物質を基体表面上に堆積させるステップを有するもの。
2. 前記静電噴霧させるステップが、生物学的機能および／または生物学的活性を有する前記不揮発性物質の溶液を静電噴霧させるステップと、静電噴霧された物質を、生物学的機能および／または生物学的活性を有する物質として基体表面上に堆積させるステップとを有する、請求項1に記載の方法。
3. 前記静電噴霧ステップおよび堆積ステップが、基体表面上に堆積される静電噴霧された物質の静電的な電荷を中性化させるステップを有する、請求項2に記載の方法。
4. 前記基体は導電性の物質からできており、基体上に設けられた誘電体層の導電性を局所的に増加させることによって、静電噴霧された物質の静電的な電荷を中性化させるステップを有する、請求項3に記載の方法。
5. 前記誘電体層は光導電性物質からできており、この光導電性絶縁層を光で局所的に照射することによって、前記誘電体層の導電性を局所的に増加させるステップを有する、請求項4に記載の方法。
6. 外部供給源から荷電したキャリアを注入することによって、前記誘電体層を局所的に導電性にし、荷電したキャリアを前記誘電体層に局所的に注入することによって、前記誘電体層の導電性を局所的に増加させるステップを有する、請求項4に記載の方法。
7. 前記誘電体層は熱導電性物質からできており、前記誘電体層を局所的に熱することによって、前記誘電体層の導電性を局所的に増加させるステップを有する、請求項4に記載の方法。
8. 前記誘電体層に孔を開けることによって、導電性を局所的に増加させるステップを有する、請求項4に記載の方法。
9. 生物学的機能および／または生物学的活性を有する不揮発性物質の基体

表面上における堆積物のサイズが、導電性を局所的に増加させたエリアのサイズよりもかなり小さい、請求項4に記載の方法。

10. 前記堆積ステップが、基体上の予め定められた位置に、前述した生物学的機能および／または生物学的活性を有する物質の堆積物を、静電場の制御の下で、予め定められた形態及び形状に形成させるステップである、請求項3に記載の方法。
11. 複数の限定された静電場を基体上に生成させ、複数の生物学的機能および／または生物学的活性を有する不揮発性物質を基体上に同時に堆積させるステップを有する、請求項4に記載の方法。
12. 前記複数の限定された静電場の位置を移動させながら、前記静電噴霧ステップ及び堆積ステップを繰り返す、請求項11に記載の方法。
13. それぞれが生物学的機能および／または生物学的活性を有する種々の不揮発性物質を含む種々の溶液を、前記静電噴霧ステップ及び堆積ステップを繰り返して堆積させる、請求項12に記載の方法。
14. 誘電体の保護遮蔽プレートを毛管の周りに配置して、静電噴霧された物質を囲い込み、分散を防止するステップを有する、請求項2に記載の方法。
15. 前記誘電体の保護遮蔽プレートの孔が開いている、請求項14に記載の方法。
16. 導電性を増加させた基体エリアの周りに、収束リングを設けるステップを有する、請求項4に記載の方法。
17. 前記収束リングに電位を与えて、全電流の最大の割合が毛管から基体を通して流れるようにして、安定した静電噴霧が達成できるようにするステップを有する、請求項16に記載の方法。
18. 堆積した生物学的機能および／または生物学的活性を有する不揮発性物質が、フィルムを形成するステップを有する、請求項3に記載の方法。
19. 堆積した生物学的機能および／または生物学的活性を有する不揮発性物質の前記フィルムが、丸くない形を有する、請求項18に記載の方法。
20. 静電噴霧前に基体上に導電性または半導電性の層を被着するステップをも有し、これによって、導電性または半導電性の層は、静電噴霧によるフィ

- フィルムを堆積させるための表面を提供する、請求項18に記載の方法。
21. 生物学的機能および／または生物学的活性を有する不揮発性物質の前記フィルムを、導電性または半導電性の層から剥離させるステップをも有する、請求項20に記載の方法。
22. 前記導電性の層が、化学的または物理的に可溶な物質を含む、請求項21に記載の方法。
23. 前記導電性の層が、親水性ポリマーを含む、請求項22に記載の方法。
24. 静電噴霧された溶液が、安定剤をも含む、請求項2に記載の方法。
25. 生物学的機能および／または生物学的活性を有する不揮発性物質が、巨大生体分子である、請求項2に記載の方法。
26. 生物学的機能および／または生物学的活性を有する不揮発性物質を含む溶液が毛管から静電噴霧され、毛管を、コロナ放電を起こさずに静電噴霧を機能させるのに十分な電位に設定するステップを有する、請求項2に記載の方法。
27. 堆積した巨大生体分子の試料を架橋結合させるステップをも有する、請求項25に記載の方法。
28. 巨大生体分子が蛋白質である、請求項27に記載の方法。
29. 静電噴霧された溶液が、可溶性の蛋白質安定剤をも含む、請求項28に記載の方法。
30. 架橋結合した蛋白質フィルムから蛋白質安定剤を洗い流し、多孔質の蛋白質フィルムを得るステップをも有する、請求項29に記載の方法。
31. 堆積した蛋白質フィルムと反応物とを接触させ、均一なフィルムを作成するステップをも有する、請求項28に記載の方法。
32. 前記反応物は水蒸気である、請求項31に記載の方法。
33. 前記蛋白質を、クラスタの大きさが5から50ナノメートルの間の蛋白質分子の微小クラスタとして堆積させるステップを有する、請求項28に記載の方法。
34. 静電噴霧ステップを、約10から40%の湿度範囲の雰囲気中で行う、請求項33に記載の方法。

35. 請求項33に記載の方法によって生成した蛋白質フィルムであって、堆積した蛋白質分子の微小クラスタを、完全に結合してはいないが高密度に充填させ、前記フィルムは、リガンドが浸透するのに十分なクラスタ間のチャンネルを有するもの。
36. 前記溶液は、生物学的機能および／または生物学的活性を有する不揮発性物質を含み、前記溶液の導電率が約500マイクロジェンス/cm未満である、請求項2に記載の方法。
37. 毛管を通過する電流が、約1から50nAの範囲に維持されるステップを有する、請求項26に記載の方法。
38. 前記巨大生体分子が核酸分子である、請求項25に記載の方法。
39. 静電噴霧されたフィルムが堆積される表面が、低い導電性を有する基体の表面である、請求項18に記載の方法。
40. 前記静電噴霧されたフィルムが堆積される表面が、多孔質である、請求項39に記載の方法。
41. 静電噴霧され、堆積した物質相互の間、または静電噴霧され、堆積した物質と基体上に存在する分子との間における、分子間の反応を防止させるステップをも含む、請求項2に記載の方法。
42. 蛋白質溶液を静電噴霧することによって基体上に形成された蛋白質フィルムであって、0.4ミクロンから20ミクロンの範囲の厚さであり、フィルムの厚さが±10%以内の均一性を有するもの。
43. 前記蛋白質フィルムが、大きさ5nmから50nmまでの蛋白質分子のクラスタを含む、請求項42に記載の蛋白質フィルム。
44. 蛋白質分子クラスタを、完全には結合させずに高密度に充填させ、蛋白質フィルムは、リガンドが浸透するのに十分なクラスタ間のチャンネルを有する、請求項43に記載の蛋白質フィルム。
45. 基体と、前記基体上に生物学的機能および／または生物学的活性を有する種々の物質を静電噴霧させた多数の堆積物とを含む試料であって、各堆積物の大きさが7ミクロン未満であるもの。
46. 種々の物質の静電噴霧させた堆積物を、1インチ平方あたり200,0

00を越える密度で形成させた、請求項45に記載の試料。

47. 生物学的機能および／または生物学的活性を有する不揮発性物質を含む溶液を静電噴霧することによって、生物学的機能および／または生物学的活性を有する不揮発性物質の試料を、基体の堆積エリア上に堆積させる装置であって、前記装置は、

ガスで満たされた空間内で、溶液から生物学的機能および／または生物学的活性を有する不揮発性物質を含む、荷電粒子の噴霧を生成する静電噴霧装置と、

選択的に照射したり、または照射しなかったりすることによって、基体表面の堆積エリア上で、荷電粒子を引き付ける第1電位と、堆積エリア以外の基体表面のエリア上で荷電粒子を引き付けない第2電位とを生成する電気感光的な手段と、を含むもの。

48. 前記基体に接続された第1の静電装置を含む、請求項47に記載の装置。

49. 前記基体の表面の下側に間隔を置いて配置されたマスクを含む、請求項47に記載の装置。

50. マスクを通過して基体上の堆積エリアを光のパターンで照射するための光源を含む、請求項49に記載の装置。

51. 生物学的機能および／または生物学的活性を有する不揮発性物質を含む溶液の静電噴霧によって、生物学的機能および／または生物学的活性を有する不揮発性物質の試料を、基体の堆積エリア上に堆積させる装置であって、前記装置は、

ガスで満たされた空間内で、前記溶液から、生物学的機能および／または生物学的活性を有する不揮発性物質を含む荷電粒子の噴霧を生成する静電噴霧装置と、

堆積エリアの近くの基体表面上を、荷電粒子を引き付ける第1の電位に保持する第1の静電装置と、

荷電粒子を反撥する電位に保持され、基体表面の上方に間隔を置いて配置され、堆積エリアの上方に位置してそこを通過させる孔を有するマスクと、

を含み、

前記マスクの孔の大きさを、前記距離に対して予め定められた比率とし、前記予め定められた比率と第1電位と第2電位とが、前記孔のある部分で電場を生成させ、これによって荷電粒子を収束させ、堆積エリアが、前記孔よりも小さいものとなるように構成されたもの。

52. 前記マスクが、荷電粒子からの電荷を取り入れることによって、前記第2の電位に到達する、請求項51に記載の装置。

53. 非導電性材料の表面が荷電粒子を吸着して、前記第2電位が荷電粒子の噴霧を反撥するようとした、請求項52に記載の装置。

54. 前記マスクが非導電性材料からできている、請求項53に記載の装置。

55. 前記マスクが導電性材料からできている、請求項53に記載の装置。

56. 前記マスクが導電性材料からできている、請求項51に記載の装置。

57. 前記マスクを第2の電位に保持させる第2静電装置を含む、請求項56に記載の装置。

58. 荷電粒子を或る堆積エリアへ堆積させた後、基体表面上の他の部分が次の堆積エリアになるように、マスクを基体に対して平行に移動させるマスク移動装置を含む、請求項51に記載の装置。

59. 前記マスクの移動中に、前記マスク上で毛管を振動させる手段を含む、請求項58に記載の装置。

60. 前記マスクが孔の配列を含む、請求項59に記載の装置。

61. 個々の物質を堆積後、基体表面に対してほぼ平行に一定の間隔だけ前記マスクを移動させる手段を含む、請求項59に記載の装置。

62. スポットのパターンが複数成分の基質の配列を形成できるように、移動距離を隣の孔との間隔よりも短くした、請求項59に記載の装置。

63. 毛管先端から離れる荷電粒子と同じ極性の電位を有し、毛管先端とほぼ同じレベルに位置し、荷電粒子を反撥する電荷で静電噴霧放電ゾーンを囲う保護リングを含み、これによって静電噴霧中の拡散を防止する、請求項51に記載の装置。

64. コロナ放電からの逆極性イオンの流れによって、基体表面において周期的に電荷を再注入させる手段を含む、請求項 51 に記載の装置。
65. 遮蔽されたチャンバーにおいてマイクロ電極の配列を含み、周期的に電荷を再注入させる手段を具える、請求項 64 に記載の装置。
66. 噴霧物質の周りに配置される非導電性の保護遮蔽プレートを含む、請求項 51 に記載の装置。
67. 前記保護遮蔽プレートに孔が付いている、請求項 66 に記載の装置。
68. 前記保護遮蔽プレートが台形状になっている、請求項 66 に記載の装置。
69. 前記保護遮蔽プレートが円筒状になっている、請求項 66 に記載の装置。
70. 前記マスクの孔が丸くない、請求項 51 に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

チップ及びライブラリの大量製造における物質溶液の静電噴霧

関連する出願についての表示

本出願は、1997年6月20日に提出された米国暫定特許出願第60/050,274号および1997年8月13日に提出された米国暫定特許出願第60/055,287号に基づく優先権を主張したもので、これら全ての内容は本願に包含されている。

発明の背景発明の分野

本発明は、蛋白質、DNAのような生体分子を含む試料物質を基体表面上に特定の形状またはパターンとして堆積する技術、およびこれらの物質の溶液を急速に乾燥させて微量の凝集物を形成する技術に関するものである。

技術背景の説明

静電噴霧法 (electrospray) においては、溶液または液体を静電的に噴霧させ、帯電したイオン及びクラスター、帯電した微小な液滴を生成するようにしている。堆積すべき物質の液体あるいは溶液は、毛管（あるいは毛管の配列）に導入され、そして高電圧を印加すると液体あるいは溶液は不安定な状態になり、液体、溶液は、直径0.3～20ミクロン、典型的には直径約0.5～2ミクロンの帯電された液滴として分散される。静電的反力によって、帯電された液滴は毛管の先端から急速に離れる。溶媒の蒸気圧が十分に低い場合、基体表面までの行程で、微小液滴は乾燥し液滴のサイズは静電的平衡のローリー限界 (Rayleigh限界) に達する。その後、微小な液滴は一連の減衰工程を辿り、サイズは約10～20ナノメートルとなり、イオン化された溶媒分子が蒸発可能なレベルまで静電場が増大する。更に乾燥した気体を通過する間にイオン化された溶液分子から溶媒は除かれる。このように急速な蒸発が進行すると液滴のすべての溶質成分は凝縮されて微小なクラスター (ナノクラスター) となる (図1)。

低蒸気圧の溶媒、例えば水のようなものの溶液の静電噴霧法は、大量の溶媒蒸気を含んだ雰囲気中の静電噴霧である場合、あるいは静電噴霧源が堆積用の基体表面から短い距離である場合は、液滴は、すべての溶媒を蒸発させず、また完全

に減少させず基体に到達してしまう。この方法は、湿式静電噴霧法と呼ばれる。揮発性の溶媒が使われ、そして気体中の溶媒分圧が低い状態、あるいは基体表面と静電噴霧源の距離が長い場合、乾式静電噴霧法では帯電された分子或いはクラスタの堆積が生ずる。

従って、この静電噴霧現象によって、帯電した微小液滴、あるいは溶媒に溶けたまたは乾燥したイオン化された分子あるいは微小クラスタの形態で物質が堆積されることになる。微小クラスタあるいは繊維が、線状ポリマを用いた静電噴霧法で生成される。堆積物の形状は、帯電した化学種の行程、速度を変化させることにより調節可能である。この調節は、雰囲気蒸気圧の調節、溶媒と溶液の濃度を適切に選択することで可能となる。

静電噴霧法の最も早い応用の1つは、放射能測定用の薄い放射能供給源の生成である。この応用では静電的な収束をもたらすコリメータが導入された（ロビンソン、1965年、ヴァン・デア・エイク（van der Eijk）他、1973年）。更に、ブルニンクス他（1961年）は、基体またはコレクタに到達する前に静電噴霧したものが通過する、中心に孔の開いたプレキシガラス（plexiglass）製の円盤を開示している。ヴァン・デア・エイク他（1973年）は、明確に規定された面積を持つ薄い放射性物質の供給源を得るために、このようなマスクを使用することができることを開示している。更に最初にブルムバーグ他（1962年）に発表されたテフロンを用いる方法では、上述したマスクの孔の直径よりも明らかに小さい放射性物質の薄い供給源の生成物を形成することができる。

その他の静電噴霧法の応用、例えば静電塗装、殺虫スプレー、生体分子の質量分光測定用のイオン供給源などは、マイケルソン（1990年）に記載されている。このようにして生体分子の静電噴霧法は、質量分光測定の利用、特に生体分子の分子質量、非共有相互作用、構造上の特徴を測定するために発展してきたものである。蛋白質イオンの完全な構造を保持すること、非共有相互作用を保持することが見出されたことは、生体分子の静電噴霧の別の応用上一番重要であった。例えば、静電噴霧質量分光測定における研究によって、トンネル走査分光測定による画像化を行うに当たって、静電噴霧されたDNA・蛋白質分子堆積物を利用するこ

とが促進された(サンダット他、1992年、モロゾフ他、1993年)。サンダット他(1992年)は金の基体上に直接DNA分子の溶液を静電噴霧したが、モロゾフ他(1993年)は、イオンチャネルを含む保護プレートを、蛋白質イオンを堆積すべき基体と静電噴霧源との間に差し込んだ。その上、加速された蛋白質イオンが雲母あるいは黒鉛と衝突した後に、蛋白質イオン及び衝突面の双方が破壊されることは文献にしばしば書かれている(レイマン他、1994年、シュリヴァン他、1996年)。

蛋白質またはその他の生体分子を所定のパターンに形成することは、従来の種々の技術を利用することにより開発されてきた。例えば、コンピュータ制御されたロボットによる微小液滴のピペッティング(シャロン他、1996年)、スクリーン印刷(ハート他、1994年)、インクジェット堆積(ニューマン他、1992年)、あるいは、フォトレジスト及びリフト・オフ技術を使用する通常の電気回路の製造技術(ナカモト他、1988年)である。また、バイオセンサ技術において事前に組み立てられたマイクロ電極の配列上に溶液から電氣的に堆積する方法も開発されたが(ストライク他、1994年、ジョンソン他、1994年)、電気堆積法の応用はほとんど蛋白質に限定され、基体の準備とマイクロ電極の位置決めに複雑な手続きを要する。その上、マイクロ電極上への溶液からの蛋白質の堆積は、直接酸化および/または電極上の電気化学反応に伴うpHの局在化によって、溶液-金属の界面上で蛋白質分子に損傷を与える恐れがある。これらの電気堆積法は、堆積されるフィルムの密度や構造を僅か数個のパラメータによって調節することができる。溶液からの電気堆積法では、試料を架橋結合した後、基体から容易に分離できるように、電極表面を水溶性ポリマで変成することができない。

静電噴霧により作成されたポリペプチド繊維のパターンをシリコン表面上に形成する方法としてシャドウマスキング技術が最近発表されたが、細胞の表面付着力を増加させるものである(ブッコ(Buchko)他、1996年)。しかしながら、この静電噴霧法の条件、即ち、溶媒としての蟻酸の利用は、大多数の巨大生体分子の機能的活性、3次元構造の保持には適合しない。一方、シャドウマスキングの利用においては、マスク上に大量の物質が静電噴霧されて失われる結果となる。電気堆積された蛋白質、DNA分子の機能的特性が保持されるかについて信頼でき

るデータはなかった。

チェン他 (1996年) は、DNA分子の堆積において、これは乾燥したステンレス電極上に電気堆積されたプラスイミドDNAを電気泳動分析した結果、多数の変成したDNA分子が堆積されることを明らかにした。DNAを緩衝溶液の液滴として電気堆積させる実験ではこのような変成は発見できなかった。

ロビンソン (1966年) は保護リング、即ちコリメータと名づけられた静電噴霧の先端の周りに2個の環状銅円盤をつけたものを公表した。

ベルトリニ他 (1965年) は、内部表面が上下が反転された截頭円錐形をした孔を公表した。

ブルニンクス他 (1961年、132-133ページを参照されたい) は、アルミニウムの薄板の基体上に、基体を覆うように据えられたプレキシガラス製の円盤に1個の孔をあけたものを発表した。この基体は回転し、その回転軸と前記の1個の孔とを整列させている。

この装置は、被覆されていない部分に噴霧物質を均一に分布させることを保障するものである。このことから2つの事を理解できる。第1に、静電噴霧の先端からの噴霧パターンは不均一であるため、噴霧物が均一に分布されるように基体を回転させる必要があることである。第2に、ブルニンクス他によるプレキシガラス円盤は、噴霧噴霧のテンプレートとして機能するものであって、静電場により荷電粒子の行程が影響を受けるというよりは、むしろ単に基体の被覆部分が遮蔽されるものだということである。ブルニンクスが、「適切に定義された場所」と呼ぶところ、即ち、明確な境界に、静電的に収束されることを期待すべきでない。

モロゾフ他 (1993年) は、中央にイオンのチャンネルがついていて(p760、図2を参照されたい)、二重層になった電極付きのプレートを含む器具を報告している。プラスチックチューブ製のイオンのチャンネルは、円錐形となっている。中央絶縁プレートによって分離された2つの電極層の間に電位差が与えられる。

最近、写真化学反応を利用したバイオチップの製造方法も、多数の異なるグループによって開発されている(U.S. パテント4562157、バーシャ (Bhatia) 他、1993年、プリチャード (Pritchard) 他、1995年、ピース他、1994、フォダー

(Fodor) 他、1991年)。これらの方法では、光を利用して、密実な支持体上で縮小化されたパターンとして生体ポリマの種々の化学合成を行なわせるか、または、光で位置決め可能な蛋白質、DNAを固定化することができる表面を供給する。光学マスク法は、光で位置決め可能な表面上の特定の箇所へ光を向かわせ、局所的に光脱保護 (photodeprotection) をもたらすために利用される。

写真光学反応を利用したバイオチップの製造方法によれば、パターンになる各々の分子の堆積には、最低3つのステップを要する。

- (1) 特定箇所への光照射による基体表面上の光活性化(光脱保護)。
- (2) 活性化された基体を堆積すべき分子の溶液に入れること。
- (3) 結合してない分子の洗浄(図2)。

これらの3つのステップは、表面上に新しい物質を堆積する毎に繰り返される。しかしながら、これらの先行技術には多数の欠点がある。これらの欠点には以下のものがある。

(i) 照射後に現れる機能化されたグループの個数が制限されるため、各々のスポット上に堆積される物質の総量が制限される。

(ii) 各堆積サイクルにおいて、堆積すべき分子の溶液に全表面を曝す必要がある。このため、照射されていない(非光活性化)場所に非特定的にこれらの分子の一部が結合されるという結果を必然的に導くこととなる。これは、蛋白質とその他分子の複雑なパターンのデザイン上、問題となる。

(iii) 他の汚染源は、表面活性不純物が常に豊富に存在している溶液の界面である。

(iv) 光照射における回折効果およびパターン領域からはみ出した光散乱のため、解像度が低下し、スポットの相互汚染が起こる。

上述した引用文書はいずれも本発明に密接に関連する先行技術を示すものとして挙げられたものではないと共に本願のいかなる請求項の特許性を判断する上での重要な資料として挙げられたものでもない。いずれの引用文献の内容あるいは日付は、出願人が出願時に入手可能なものに基づいてはいるが、それらが完全に正確であるということを認めるものではない。

したがって本発明の目的は、上記のような先行技術の欠陥を克服することである。

本発明は、静電噴霧の堆積によって複数の不揮発性物質の試料、例えば複数の試料を含むチップを製造する方法を提供するものである。このような試料は、不揮発性物質の堆積物の他の物質との相互作用を測定するために利用される。更に、本発明は、各々が一つまたは複数の生物学的あるいは他の種類の分子の試料を含む多数のチップを同時に製造する方法を提供するものである。このようなチップには多数の用途がある。特に単一成分チップは、化学センサの取り替え可能な感応素子として利用される。複数成分チップ（ライブラリ）はマイクロELISA（酵素免疫検定法）、核酸分子の複合化（hybridization）の分析、有効な酵素阻害物質のふるいわけ等のような、多重分析に利用される。マイクロチップ（チップ上の各々の試料がミクロン単位のもの）、マクロチップ（ミリあるいはセンチメートル単位のもの）双方とも同様の技術によって製造される。このようなマクロチップは、例えば、アレルゲンを感じさせるための診断検査、即ち、微生物の抗生物質への感応分析キット等の製造に利用される。

その上、本発明は、ナノグラム単位の試料から相互結合した蛋白質、DNA分子の微小試料の効率的な製造方法を提供する。更に、静電噴霧法により堆積されたマイクロ試料の蛋白質、DNA分子フィルムは、その機能的特性を保持する。

更に、本発明は、上述した静電噴霧法により形成される試料生成物はもちろん、静電噴霧法による不揮発性物質の試料製造用装置までも提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は、静電噴霧の毛管の先端からの種々の距離における噴霧物質の種々の状態を説明する静電噴霧プロセスを示す線図である。ウェットゾーンでは溶液の微小液滴が優勢であり、ドライゾーンでは乾燥したクラスタとイオンが優勢である。

図2は、先行技術による光位置決めにより機能化された基体上への分子の堆積のステップを図示したものである。

図3Aと図3Bは、静電噴霧法により誘電体マスクの孔を通過した荷電粒子の堆積における、静電集中効果（図3A）及び電気収束（静電レンズ効果；図3B

）を示す線図である。

図4は、誘電体マスクの孔の配列（図4A）を通過して多数のスポットに対して静電噴霧された荷電粒子の分布と、光導電性誘電体層に光を照射された導電性エリアに対する堆積（図4B）について図示する。図4Cは、図4Bの基体の断面図を示す線図である。

図5A－5Dは、ポリプロピレンマスク（図5A）、マスク上の孔を通過し、導電性の酸化スズ層で覆われたガラス上に対する静電噴霧で堆積されたミオグロビンのスポット（図5B）、同様のマスクを通過し、湿った雰囲気中において雲母上に堆積された色素のスポット（図5C）、レーザー光線の回折パターンにより照射された光導電性の誘電体層上に堆積された色素のスポット（図5D）を示すものである。

図6は試料フィルムの製造および分離プロセスを示す線図である。

図7は液体窒素で冷却された基体に対する静電噴霧法による堆積を線図的に示すものである。

図8は、配位結合の結果による蛋白質スポットの大きさ、弾力性の違いを測定することにより、蛋白質スポットの基質に対する配位結合を検知することについての走査型／原子間力顕微鏡の利用状況を線図的に示すものである。

図9は、各々の物質がマスク上の孔を通過し基体に静電堆積された後、基体への相対的な位置を移動する方法により、複数成分の基質の大量製造を線図的に示すものである。

図10A～10Fは、6-merオリゴヌクレオチドについてのライブラリの組み合わせを製造するために利用される、一連の6個のマスクを示す。この白い部分はマスク上の孔を表わすものである。

図11は、異なる種類の色素スポットを配列した多数の複数成分マトリックスを形成した多孔質のIMMOBILON-P（PVDF：ポリビニリデンジフリオリド）メンブレンフィルタを示す。

図12A、12Bは、ペルオキシダーゼ溶液の静電噴霧法による堆積物（図12A）、湿ったIMMOBILON-Pメンブレンフィルタ上に対するアルカリ

性ホスファターゼ溶液の静電噴霧法による堆積物（図12B）を示す。黒い点はペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼの酵素反応による不溶性の生成物の集

積である。また、黒い点はメンブレンフィルタ上にある堆積された酵素の位置を明らかにする。

図13は、静電噴霧法によりIMMOBILON-Pメンブレンフィルタ上に堆積された種々の蛋白質抗原（人体、ウシアルブミン血清、オボアルブミン、ヒトヘモグロビン）のマイクロELISAによる分析結果を示す。また、これらの蛋白質抗原は、第1にヒトアルブミン血清に特効のあるウサギの抗体を用いて、第2に、アルカリ性ホスファターゼが共役結合したアンチウサギIgG（免疫グロブリンG）分子を用いて、免疫酵素技術により検知されたものである。

図14A、14Bは、静電噴霧法により製造されたコンカナバリンAのフィルム（図14A）、馬の肝臓から採取したアルコール脱水素酵素のフィルム（図14B）を示す。蛋白質のフィルムは、マスク上にある1つの長方形の孔（ 0.8×0.2 mm）を通過し、アルミニウム電極上に予め堆積された導電性ポリマーの補助層フィルム上に堆積したものである。

図15A-15Cは、静電噴霧法により堆積させたヒトヘモグロビンの多孔質構造（フィルム表面の画像は、乾式で堆積させた後、走査型フォース顕微鏡（scanning force microscope）で取得したものである。図15A）、フィルムを「焼成」することにより結果としてフィルム構造に変化すること（図15Bの画像は、同じフィルムを湿った雰囲気中に曝した後の構造を表わす）、グラフは、従来の蛋白質溶液を乾燥させる方法で取得したフィルムと比較して、静電噴霧法によりウシアルブミン血清を堆積させたフィルムの浸透性は相当に向上することを（図15C）を示す。図15Cでは、縦軸は、色素分子が浸透する場合の湿った雰囲気中において湿った蛋白質フィルムの表面から、均一な色素の微粒子までの距離の二乗を表わす。白抜きの丸は乾式でのプロモフェノール・ブルーのデータ、黒丸は静電噴霧法により堆積されたフィルムにおけるプロモフェノール・ブルーのデータを表わす。白抜きの四角は乾式においてのJanus GreenB色素の浸透のデータを表わす。

表わし、黒四角は静電噴霧法による堆積フィルムにおいてのJanus GreenB色素の浸透を表わす。横軸は浸透時間である。

図16A-16Cは、2つのタイプのプラスチック製保護遮蔽プレート、及び静電噴霧された物質の均一な分布を線図的に示すものである。この遮蔽プレート

は、静電噴霧された物質が目標の基体からそれてしまうのを防止するのに利用される。図16Aでは、台形の遮蔽プレートは、直接荷電粒子を基体あるいはマスク上の孔に対して集中させる。図16Bで示されたデザインは、広い場所に渡って、マスクの壁に囲まれた円筒状の部分に対して噴霧された物質を均一に堆積させることを説明する。これら2種類のデザインにおける遮蔽プレートは、母材あるいは孔のあいたプラスチックで作ることができる。後者のデザインの方が、荷電粒子の流れから空気（風）の流れを分離することが容易という点で有利であり、そのため、静電噴霧された物質の集中、乾燥が容易になる。図16Cは、孔の開いているプラスチック製の円筒状の遮蔽物内側における、静電堆積された物質の、ベル型の分布とは相反する均一な分布を表わす。ベル型の分布の典型は、円筒の孔の直径が基体一毛管間の距離より小さい場合に遮蔽物なしで堆積されたものである。白抜きの丸は、基体から毛管が高さ55mm、黒丸は高さ43mm、四角は30mmの場合の堆積を表わす。直径43mmの孔のあいた円筒は、単繊維のナイロン布（フロリダ州、マイアミレイクのスモール・パーツ社製、CMN-1000-A型、1000ミクロンのメッシュサイズ）からできている。

図17は、空気ジェット補助の静電噴霧法により製造された巨視的なサイズの色素パターンを示す。

図18A、18Bは、静電噴霧法によるショ糖不存在下（白抜きの丸）、あるいはショ糖存在下（黒丸）で堆積されたアルカリ性ホスファターゼに対する比活性の回復に与える電流の効果を示し、図18Aは、毛管の内部に電極があるもの、図18Bは、毛管の外部に電極があるものである。ショ糖は、乾燥した蛋白質の50%相当の重量が加えられている。縦軸は、最初の溶液の比活性と静電噴霧法によるアルカリ性ホスファターゼ堆積物の比活性との比率を表わす。静電噴霧による堆積は、相対湿度 $65 \pm 5\%$ 、溶液流量 $6 \mu\text{L/h}$ の状態で行われる。

図19Aと図19Bは、堆積物のそれぞれ線図（図19A）および断面図を示したものであり（図19B）、マスクとして利用されるポリプロピレンフィルムの孔を通過する蛋白質の静電噴霧法によって堆積物の高さ－横の比率が大きい試料の配列が形成されている。

図20A－20Cは、イオン源として使われる3種類の毛管を図示する。図2

0Aは、外部電極の毛管を示し、図20Bは、内部電極の毛管を示し、図20Cは、液体ブリッジ（liquid bridge）の毛管を示す。参照番号は、それぞれ、1はプラスチック製チューブ、2は銀の層を塗布したガラス製毛管、3は導線、4はステンレススチール製チューブ、5はガラス製毛管、6はタングステン、ステンレス、プラチナ、あるいは金の内部電極、7はガラス製毛管を示す。

図21は、実施例11で微量天秤上に蛋白質を堆積するために使用するチャンバーを図示する。

図22は、直接乾燥後におけるアルカリ性ホスファターゼの比活性の回復に対する糖質の効果を示す。白抜きの丸と黒丸は、それぞれ、ショ糖とトレハロースの結果を示す。比活性は、初期の溶液の比活性に比例する。

図23は、アルカリ性ホスファターゼの静電噴霧法による堆積後における比活性の回復に対する湿度の効果を示す。静電噴霧法により堆積させた試料の比活性は、初期の溶液の比活性と比例する。静電噴霧法による堆積の条件は、内部電極の毛管において+4kV、電流10－50nA、流量6μL/hである。

図24は、本発明の装置の概略図である。

図25は、図24で示された静電噴霧チャンバーの概略図である。

図26は、静電噴霧チャンバーの毛管の斜視図である。

図27は、静電噴霧チャンバーの格子状遮蔽プレートの斜視図である。

図28は、静電噴霧チャンバーの収束リングの斜視図である。

図29Aは、静電噴霧チャンバーの保護遮蔽プレートの断面図である。

図29Bは、静電噴霧チャンバーの保護遮蔽プレートの分解斜視図である。

図30は、中間試料のホルダの分解斜視図である。

図31は、試料ホルダの斜視図である。

図32Aは、図25と類似する同様に静電噴霧法の第2の好適実施例の正面概略図である。

図32Bは、図32Aの詳細図である。

図33は、マスク移動装置の分解斜視図である。

図34は、図25と類似する静電噴霧チャンバーの第3好適実施例の線図的正面図である。

発明の詳細な説明

本発明は、生体分子(例えば、蛋白質、DNAのような巨大生体分子)、有機体分子(抗生物質、薬学上のものなど)、無機物質、塩類、無機コロイド等を含む不揮発性物質の堆積物試料の製造方法を提供するために開発されたものである。生体分子等は、特定の形状および配列となって堆積される。この方法は、従来の生体分子パターン化の方法に対して以下の利点がある。(1)写真光学法のように、異なるスポット同士の相互汚染がなく、チップ表面全体と溶液の接触がない。

(2)インクジェット法とは対比的に、同時に多数のチップに堆積することができ、従って処理が促進される。(3)インクジェット法と比較して、荷電粒子、分子のサイズが小さいため、従ってより小さいスポットの製造を容易にする、(4)マイクロチップ、マクロチップを製造するのに同じ技術を使うことができる、(5)何らかの気体中において、及びまたは低温下において、誘電体の液体を使って堆積は行われる。

本方法は、1つの非円形の孔、あるいは(様々な形の)孔のパターンの配列のマスクを使う。そして、このマスクは、静電噴霧源と試料が堆積される基体表面の間に挟まれる。このようにして、帯電した微小液滴、クラスタ、イオンはマスクの孔、あるいは、孔の配列を通過し、そして基体表面へ向かうこととなる。マスクが孔の配列を持つ場合は、本発明の方法によれば、マスクに多数の孔があるため、基体表面上に別個のスポットを、事実上同時に形成することができる。各々の化合物の堆積後、マスクを移動させることにより、それぞれの孔の下に複数成分のチップ(ライブラリ)が、結果として形成される。

局所的に電界を作り、荷電粒子を引き付けるその他の方法は、本発明の範囲内

に含まれる。特に、目標電極上の光導電性誘電体層の導電性は、光の照射により増加させることが可能であり、これは、図4Bに図示される。堆積のパターンは、図5Bで説明するように、光の照射のパターンに従う。誘電体層の部分的加熱、荷電したキャリアの注入(レイザー他、1969年)、照射、誘電体の導電性を変更するものとして知られるその他の物理的要素も、孔付きのマスクの場合と同じように静電噴霧の堆積を調節するために利用される。

基体に近接して配置され、基体と同じ電位が与えられた薄い導電性マスクを通して静電噴霧の堆積がされると、堆積物は、マスク上の孔の形に正確に従い、試料分子が、堆積物の上に均一に分布されることとなる。しかし、試料中の多数の分子が、マスク上に堆積されて損失となる。従って、この静電噴霧法の静電場の構成は、非常に非効率的で時間を消費するものである。

しかし、このマスクに、静電噴霧源及び微小液滴と同じ極性の電位が与えられる場合、静電噴霧された物質の優先的な堆積が、非常に効率的に行われる。その理由は、帯電したマスクが静電噴霧された物質を反発し、そして、静電噴霧されたものがマスクの孔を通過するように、その軌道を変化させるからである。帯電した誘電体あるいは導電性のマスクの反発効果と関連する現象は、ここでは区別される。第一の現象は、「静電集中」と呼ばれ、これは、孔に近接した場所、或いは光導電性の誘電体上の光を照射されたスポットに近接した場所以外のマスクの全てのエリアにおいて荷電粒子を反発するものである。そこで粒子は、図3に示すように孔を通過する静電場によって集められる。毛管52内に据えられた正電位が与えられた電極50によって、毛管先端部から静電噴霧される不揮発性物質54の溶液は不安定な状態となり、この物質は、毛管先端から、たいまつ状56のように静電噴霧される。基体58へ向かう粒子の軌道(矢印で示す)は曲げられ、そして、帯電したマスク62上の孔60を通過し収束する。マスクの孔に相当する形状および大きさにフィルム64に堆積される。全ての荷電粒子に対して図3Aに示すような軌道ができる場合にのみ、このような均一な堆積が可能となる。第二の現象では、荷電粒子が孔に進入する際の空間的な角度が、図3Bに示すように(最も低い、静電噴霧可能な電圧での静電噴霧)あるいは図4に示すよ

うに（多数の近接した孔のあるもの）、垂直に近くなる場合は、孔、あるいは光を照射されたスポットの近くの不均一な静電場は、粒子の軌道を孔の中央に向けて偏向させるものである。、この孔の下方における堆積物の再分布は、「静電集中効果」あるいは「レンズ効果」と称される。後者の場合は、静電噴霧された物質は、マスク上の孔よりも小さいサイズのスポットとして堆積される。図3Aと図3Bに示す電荷の全ては、全体のプロセスに影響を与えず、逆の電荷にすることができる。

この静電レンズの作用は、電子顕微鏡のものとは顕著に異なる。その理由は、

定常状態の大気中では粘性力が勝るため、真空状態において軌道を決定する慣性力は、静電レンズにおいては無視できるからである。この静電レンズ効果では、堆積物のサイズがマスクの孔よりも相当に小さいという利点があり、このことは、孔をスポットと同じ程度に小さくする必要がないためミクロンあるいはミクロンより小さい堆積物の堆積（スポット）に合致するマスク製造の技術的問題を相当に減少させる。

マスクとしてポリプロピレン織布を利用した静電レンズ効果の結果を図5A～5Bに示す。マスクとして利用されるポリプロピレン織布において互いに47ミクロンだけ離れた23～24ミクロンの孔（図5A）よりも相当に小さい5～7ミクロンのサイズの蛋白質スポット（図5B）が得られる。静電集中の利点は、マスクは帯電した分子のごく少量しか吸収しないため、静電噴霧された物質が100%近い効率で堆積されることである。図14A、14Bは、マスク上における単一の孔の存在のため、静電集中効果が抑圧された状態で、均一な堆積物フィルムが製造できることを示すものである。

静電レンズ効果は、実施例10に説明するように、外観上、高さ－横比率の高い試料を製造するためにも利用され、これによって、RNase試料の針状の配列は、図5Aで示されるマスクを利用することにより製造される。このような棒状の試料の配列は、淡緑色の色素のような有機物質でも製造される。これらの実験から、比較的乾燥した状態においてさえ（実施例10では湿度18%）、蛋白質フィルムは、厚さ40ミクロン以上のフィルムを通して荷電粒子を通過させるのに

十分な導電性を持つことを結論づけることができる。静電噴霧の堆積における、高い電界と荷電粒子の注入は、有機物質の堆積物と同様に、このような蛋白質堆積物の導電性増加の原因となる(レイザー他、1969年)。

本発明で使用するマスクは、単一の孔、あるいは孔の配列を有し、そして、このマスクは、静電噴霧源(毛管)と目標物の間に配置される。このマスクは、非導電性物質からできていることが好適であり、マスク上では、静電噴霧法による最初の荷電分子がマスク表面上に吸着される時に、静電集中効果が自動的に達成され、従って、その後の荷電粒子の吸着は静電的に阻止される。荷電分子の吸着層を有するマスクの非導電性の部分(エリア)は、静電噴霧によるすべての荷電分子をマスクの孔に指向させて基体上への堆積させる機能を持っている。同様の電気集中効果は、誘電性の光導電性層が基体として利用された場合にも観察できる。

このマスクは、導電性物質から作ることもできる。しかし、本発明の方法で使われる導電性マスクの電位は、荷電分子を孔へ指向させるために、毛管上の電極の電位と基体上の電位の間調整するべきである。これによって、静電噴霧された物質の相当量の損失を防止できる。

静電集中において、互いに近接した孔の配列をもつマスクでは、静電レンズ効果が極めて容易に起きるが、単一の孔、あるいは孔の直径よりも大きく離れた複数の孔では、静電集中は少ない、或いは無いと言えることを確かめた。一つの孔をあけたプラスチックプレートを基体上に直接配置する場合には、プラスチックプレートの厚さを孔の直径の0.5倍にすると最大の静電集中効果が得られる。しかし、同じような孔をあけた薄いマスクを、基体から厚いプレートの表面上部までの距離だけ離間するように基体の上方に配置する場合には、静電集中効果の程度は減少し、堆積物の形状は孔の形状から変形したものとなる。これらことから、静電力だけではなく、イオン風により引き起こされた空力学的な力が、静電集中のプロセスを制御することを示している。静電集中は、毛管に印加される電圧と(毛管への印加電圧が最低での堆積は、集中が大きくなる)、孔に対する毛管の位置(毛管が孔の上方に接近して配置されると、最も小さいスポットが得

られる) に依存することもわかっている。

このように、任意の形状の一個の孔を用いて物質を均一に分布するためには、以下の条件が満たされていることが好適である。

(i) 誘電体マスクが薄い。

(ii) マスクは基体の近くに配置される。

(iii) 静電噴霧源は、孔の真上に配置されていない。

(iv) 基体とマスクを、マスクの孔の中央を通過する垂直軸の周りを回転させる。

(v) 孔の近隣の空気を攪拌させる手段を設ける。

このような条件の下では、堆積物の形やサイズは、孔の形やサイズに従う。

それぞれの孔で静電集中させるには、台形の形をした孔が付いた厚いマスクが

好適である。

マスク 6 2 が誘電体、絶縁体、半導体物質を含む場合、電極からの粒子がマスク表面上に吸着されると、静電的な荷電が発生する。マスクは、電氣的に分離される (あるいは絶縁) のが好適であるが、選択的に、過度に集められた電荷を幾分ゆっくり排出させるためにアースさせること、または後述する静電的な帯電装置を使うこともできる。

図 4 A は、図 3 A と 3 B と同様に、多数のマスクの孔 6 0 を図示したものである。この装置は、ホルダ 5 0、荷電粒子 5 6 の霧を作り出す電極 / 毛管 5 2 を含む静電噴霧器が図示される図 3 A、3 B と同様である。しかしながら、図 4 A で 6 2 と名づけられたマスク 6 2 は、金属製、あるいは少なくとも部分的には導電性のもの (例えば、異なる導電性をもつ物質、または半導体を含むものをサンドイッチ構造にしたもの) からできており、そして、誘電体であることが好適である。導体の場合には、静電学で良く知られているように、どの電荷も (例えば、マスク 6 2 上の電荷でも) 表面上を移動し、角や先端部に集中する。孔が幾何学的に同一であれば、全ての孔の周りにおける電位の勾配は、同じになるべきである。

基体 5 8 は、誘電体、導体であってもよく、あるいは種々の導電性を持つもの

でもよい。基体58は、静電装置（即ち、帯電装置、すなわち静電電位誘起装置）581に接続されていることが好適であり、選択的に電圧調節装置582を付属させても良い。これらは、図3A、3Bの装置において付属させることも可能である（しかし、図3A、3Bでは示さず）。この第1静電装置は、堆積部分64の近くの基体58の上部表面を、荷電粒子56を引き付ける第1の電位に保持する。

マスク62は、絶縁することもでき、その最適の極性のために、電荷の吸収（または減少）に依存させることも可能であるが、選択的に第2の静電装置621に接続しても良い。電圧調節装置622が付属しているもの、または基体58から独立したものであることが好適である。電圧は、マスク62上に堆積させずに、目標堆積エリア64に粒子を集中させるために最適化することができる。例えば、マスク62は、荷電粒子56に対して電位的に反発する状態に保たれるのが好適である。このようにして、物理的な遮蔽物、かつ静電場影響装置として作用させ

ることができる。

静電装置581、621はバッテリー、電源供給部、ボルタ電池等を備えることができる。調節装置622は、マスク62の電圧を調節する、何らかの手動、または、自動装置とすることができる。

図4Bは、その他の好適実施例であり、光の使用により様々な電荷集中のパターンを作り出すものである。

このマスク62は、単に導体、誘電体に限定されず、どの物質からできていても良く、または光導電性ポリマー、半導体のような特別な物質を含むものからできていても良い。図4Bでは、マスク62は、光学マスク162として具体化され、基体の上よりむしろ基体の下に配置されるのが好適であり、ここでは158と名づけられている。このマスクは、基体下部に影を映す。この好適実施例では、基体158は、感光性の電氣的性質（本明細書では、これを「電気感光性(electrophotonic)」と呼ぶこととする）を持つ物質、例えば、半導体、光に応答して表面に電圧を生じさせる光起電力構造のものの層、感光性ポリマー、または他の

物質の層を含むものである。この好適実施例では、基体158は、電極として機能する透明な導電性プレートと光導電性の層を含むサンドイッチ構造を備える。

層158の最も単純な構造は、堆積部分64の下に孔160を備える不透明物質の有孔プレートである。ランプ、レーザー、その他の光源170は、後述するように孔160を経てコリメートされた光を照射して、荷電粒子56の堆積物を形成するのが好適である。

或いは、本発明では、所望の光線パターンは、マスク162を用いる代わりに、変調走査レーザー光線、ホトセル或いはレーザーアレイを選択的にトリガしたり、またはこれらに相当するものにより作することもできる。

図4Cは、図4Bにおける基体158の正面の断面図である。下から順に、基体158は、ガラス、アクリル製等のプレートからなる透明な物理的支持層1581を含み、透明な導電性層1582、感光性ポリマーのような感光性層1583を含むことが好適である。例えば、透明な導電性層は、透明な導電性物質あるいは基体1581上に部分的に金属製のフィルムを含むものとすることができる。

典型的な光導電性ポリマーフィルムは、光で導電性となり、光が無いと絶縁性となる。従って、マスク160を通過して下から照射された層1583の部分は、導電性プレートと同じ電位となる。その理由は、過剰な静電電荷は導電性層1582を介して排出されるからである。層1582は、オプションの電圧調節装置の付いた静電装置95に接続されるのが好適である。また、層1582は、単純にアースすることもできる。

その間に、照射されなかった層1583の部分は、吸収によって異なる電位に達することになるか、または、単に非電導性によって以前の電位を保持することになる。この異なる電位によって噴霧物の粒子56は反発され、照射された部分の電位によっては引きつけるため、この粒子は、光学マスク162における孔160の上の堆積エリア64のみに堆積されることになる。

図5Dは、本発明の電気感光法によって達成された結果を示すものである。

照射のパターンは、写真のネガとすることができ、この場合には、装置95か

らの極性を反対とすることによって同じ結果を得ることができる(図には示さない)。堆積物64を生成するための電位を作るための、その他の何らかの電気感光法の手段も、本発明の範囲に含まれる。

静電噴霧された場合に蛋白質、DNAのような生体分子の構造的、機能的特性を保持するために、静電噴霧源の毛管先端における電界場の強度は、静電噴霧が機能するのに十分な強度にすべきであるが、コロナ放電が起きるほど高くてはいけない。コロナ放電は、生体分子の機能的特性を破壊するからである。静電噴霧源の毛管先端における電界場の強度は、定電流、及びまたは、定電圧を維持することによって調節することができる。最低電圧、最低電流は実験により決定される。静電噴霧を有効にさせる最低電圧は、毛管の半径、溶液の導電性、流量、毛管-基体間の距離に依存することが判明した。毛管の直径を約20-30ミクロン、毛管-基体間の距離を約1.5-4.0mmとし、電圧を3-5kV、流量を1μl/分で到達する電流約10-50nAでは、蛋白質溶液は、非常に効果的に静電噴霧される。電圧が6kV以上で電流が100nAを越えると、生体分子の性質が静電噴霧のプロセスにおいて破壊されやすい。空気をフロンガス、炭酸ガス、その他のコロナ放電を抑制するガスに置換すると、コロナ放電を防止するのに役に立つ。静電噴霧がガスジェット噴霧により補助されると、ミクロンサイズの液

滴が、静電噴霧のみで必要とされる電圧より相当低い電圧で得られるため、コロナ放電を抑制することができる。ジェットにより補助された静電噴霧は、静電噴霧のみより相当に速い流量でも安定した分布を得ることができるため、物質の堆積を強力に促進させる。空気ジェット補助は、超音波補助(ブラッドフォードにあるアナリティカ社の超音波噴霧器具のようなもの)の静電噴霧と同じように、大きな試料、大量の試料を特に効果的に堆積させることができる。溶液の流量が1mL/minに至るまで容易に分散させることができるからである。

孔の配列を有するマスクを経て、単一の毛管から複数スポットを同時に静電噴霧堆積させるためには、マスク上の毛管を振動させることが好適である。また、静電堆積物のための基体/支持体は回転させることが好適である。それぞれのス

ポットの至るところで、静電噴霧された粒子を均一に堆積させるためである。基体上の堆積場所における堆積時間を同じとする条件の下で、毛管と基体とを他の態様で相対的に移動させる場合にも、堆積は均一となる。そして、その移動は、当業者によって決めることができる。静電噴霧物質を均一に堆積させる他の方法は、下記に説明するように孔の開いた保護プレート／遮蔽プレートに毛管を設置することである。一つの試料を複雑な形状を有するが、均一な厚さの堆積する場合(例えば、長方形の蛋白質断片)、できれば毛管を静止させ、マスクに設けた非円形の孔の真上には位置させず、マスクと基体／支持体とを回転させるのが好適である。このようにして、マスクと基体／支持体とを回転させると、荷電粒子がどの方向からも均一に孔に接近するようになり、孔の静電集中効果を避けることができる。一般に、毛管先端から離れる微小液滴の帯電電荷と同じ符号の電位が印加された保護リングを毛管先端のレベルとほぼ同じレベルに配置し、静電噴霧放電が起る場所を、帯電された微小液滴を反発し、静電噴霧中の散乱を防止するような電荷で囲むようにする。保護リングは、図16A、16Bにおいて線図的に示される2つの実施例のようなプラスチック遮蔽プレートと効果的に置き換えられることがわかっているが、このような実施例にのみ限定されるものではない。これらのプラスチック遮蔽プレートは、台形または円筒形とすることもできる。静電噴霧された物質の一部分のこのような遮蔽物の壁への堆積によって、壁が帯電され、それ以上の散乱を防止させる。同様に、このようなプラスチック遮蔽物

の壁は、空気を透過させるプラスチック織布で作ることができることも判明した。

この後者のデザインには3つの利点がある。

- (i) 静電噴霧された物質から溶媒を容易に乾燥させること
- (ii) 遮蔽物に囲まれることにより大量の荷電粒子を閉じ込めるさせ、そして電荷の相互反発と合わせて、図16Cで説明するように、このような遮蔽プレートにより限定された場所に均一な堆積をさせる結果になること
- (iii) 図16Aで図示したような台形の格子は、粒子の流れの集中を容易にさ

せること(これは特に微小試料の堆積において重要である)、である。

上述した方法における堆積の効率は、遮蔽物及びマスクの物質の誘電体(バルクおよび表面の導電性が低いことが要求される)としての特性、先端-基体間の距離、及び孔の全面積に依存する。図5Aで説明するような複数の孔、或いは直径1.5-5mmの単一の円形の孔においては、効率70-80%を容易に得ることができる。

孔を $0.2 \times 0.7 \text{ mm}^2$ に縮小させると、結果として効率は4-10%に減少することとなる。プラスチックマスクの水平面において同軸に設置された追加の収束リング(直径2-5mm)の導入は、収束リング上で適正に調節された電位において効率を相当増加させることが判明した。電位を調節するためには、試料を通過する電流と同様に、毛管を通過する全電流を同時に測定する必要がある。これからの説明では、正の電位が毛管に印加され、試料ホルダがアースされているものと仮定する。収束リングの電位を増加させると(アースされている状態で、ゼロから)、試料電流の増加が観察され、リングの電位が更に増加し電流が最大値を通過すると、その後、電流は静電噴霧の発生が完全に抑止されるまで減少する。リング電位の増加による毛管を通過する全電流の低下は、静電噴霧されたいまつ状のものの強度が弱まることを伴う。試料ホルダを通過する電流が全電流の50-90%であるという条件下の静電噴霧法における堆積は、ミリメートルサイズ以下の孔のマスクにおける1個の孔を通過して結果として20-40%の効率で蛋白質を堆積させることが判明した。同時に多数の微小試料を堆積させることは非常に効率的であり、通常は収束リングを必要としない。しかしながら、複数の孔を有する誘電体マスクを、各々の孔がリングの中央になるように複数リング

の収束ネットで覆うこともでき、全てのリングは、上述した単一の孔におけるコレクタのように、電圧調節機付きの電源供給部に接続することができる。

誘電体マスクの小さな孔を通過して堆積する場合の、その他の潜在的な問題は、孔の近くの誘電体マスク上に直接噴霧された物質の堆積が、全体の効率を相当に減少させることである。このようなマスク表面上への堆積の程度は、利用され

るポリマーの種類その他の条件、例えば電圧、噴霧された粒子の電荷、収束リングの存在・直径に依存して変化するものである。特に、本発明者の実験室では、マスク物質として雲母を利用するとマスク表面上への堆積が減少することが判明した。おそらく、プラスチックに比べて、雲母は、注入された電荷の移動度がより低いこと、または正孔がより少ないことが理由であるが、このような移動度は高くすることもできる(レイザー他、1969年)。

荷電粒子が堆積される基体または支持体は、高い導電性を有するのが好適である。しかしながら、その他の物質、即ち全体の導電性が低いもの(半導体)または表面の導電性が低いものも、同様に基体として利用できる。このような物質の例は、紙、親水性プラスチック、メンブレンフィルタ(例えば、PVDF製のIMMOBILON-Pフィルタ、ニトロセルロースフィルタ)、雲母、ガラスが含まれる。乾燥した状態で雲母とガラスは導電性を持たないが、濡れた状態または湿った空気中では表面に導電性がある。フィルタも同様に、高い(70%以上)、または適度な湿度(30-50%)の空気中で、基体として利用するのに十分な導電性を持っている。

本発明の好適実施例の一例では、乾燥した雲母、ガラス、乾燥したプラスチックのように、表面に導電性を持たないものに対しての静電噴霧法による堆積は、図34で図示するようにコロナ放電からの逆極性のイオン流によって周期的な電荷の再注入を導電性の無い表面に対して行うことにより達成される。逆極性のイオン流は、遮蔽されたチャンバーにおける電極の配列によって発生する。このような電荷の再注入は、噴霧と電荷再注入のサイクルを繰り返すことにより荷電粒子の連続層が基体の上に堆積されるという利点がある。この利点があれば、基体上に積み重なった荷電分子はそれ以降の堆積を抑止することとなる。雲母の表面の例では、雲母シートが、回転するプラスチック製円盤上に敷かれ、その回転

の周期でマイクロ電極の直下を通過することにより電荷を再注入される。雲母に関しては、毛管に正、負どちらの電圧もかけることができる。この具体例の雲母において表面導電性を減少させるためには、堆積させる間は、赤外線源または乾燥した温風を利用した加熱により雲母表面を乾燥させる必要がある。堆積は、例

えば大気中でも、または雰囲気調節されたチャンバー内でもできる。

或る状況下においては、基体あるいは支持体から堆積物質を、試料フィルムとして剥離することが望ましい。この剥離を助けるために、試料－基体間に中間層を設けることができる。このようにして、測定機器へ試料フィルムを移動させることができる。この中間層は少し導電性を持つ必要があり、また静電噴霧により堆積された生体分子が架橋結合した後で容易に除去できるものでなければならない。中間層として利用できる物質の例としては、以下のものがある。

(1) 水の存在、及びまたはその他の条件下、即ち、pHの変化において、ゆっくりと膨潤、溶解するポリアクリルアミドまたはポリエチレングリコールのような水溶性ポリマー層。

(2) メルカプトエタノール溶液に接触した場合に、分解（化学分解）可能な二硫化物の結合を持つ市販されているポリマーの層。そのため、結果としてポリマーは分解する。

(3) 堆積された生体分子に低い接着力を持つ高度に分散された炭素の層。

(4) 導電性化合物である炭素系ポリマーまたその他の低融点導電性ポリマーの層である。図6は、中間層上の試料フィルムの製造プロセス、及び中間層からの剥離のプロセスの好適実施例を図示したものである。中間層としての半導電性の補助層80を、毛管84から静電噴霧、または他の既知の方法を用いて基体82上の導電性基体の層81上に最初に堆積する。そして、その後、所望の生体分子の試料フィルム86を、静電噴霧法を利用してマスク90における孔88を通過して堆積させる。試料フィルムは、溶媒96を用いて半導電性の補助層を溶解させることにより基体から剥離され、測定機器94の先端部に取付けることができる。或いは、フィルムを単純に基体から持ち上げることで、剥離した試料とすることもできる。試料フィルムの剥離としての中間層の好適実施例は、アルギン酸の補助層であり、アルギン酸は酸性のpHでは溶液に不溶性であるが、アルカリ

性のpHでは容易に溶液に溶解可能である。

静電噴霧法の堆積において、生体分子の例として蛋白質を使用した場合、蛋白質フィルムの構造とフィルム上の蛋白質分子の機能的特性は、静電噴霧の飛行行

程、電圧により調節される荷電粒子の速度、電荷の符号、蛋白質分子が静電噴霧される時の温度・湿度、溶液の蛋白質濃度、安定剤の存在に依存する。短距離、例えば基体－毛管間が約15mmあるいは静電噴霧が湿った大気中（相対湿度70－80%以上）で、即ち湿式静電噴霧法で行われる時は、静電噴霧された荷電した微小液滴は減少せずまたは乾燥イオンを生成しないで表面に到達する。基体上に堆積した微小液滴を乾燥した後で得られる試料フィルムは、直接基体に蛋白質溶液を適用させて蛋白質を乾燥させる従来の方法によって得られた試料と多くの共通点がある。Ca²⁺のようなりガンドに対する機械化学的な反応において、導電性のSnO₂層で覆われたガラス表面上への湿式静電噴霧法の堆積により生成されたα-ラクトアルブミンのフィルムと、従来法により生成された同様の酵素のフィルムとでは目立った相違は検知されていない。

生体分子の静電噴霧法による堆積は、希薄生体分子溶液の微量濃縮の手段として利用することもできる。静電噴霧の条件（湿度40－50%以下、毛管－基体間の距離30mm以上、乾燥したガスの流れ）を変化させることにより、微小液滴においての生体分子の濃縮が起きる状態で堆積は乾燥法で行われ、そして乾燥したナノクラスターと生体分子のイオンは基体上に堆積される。走査型原子間力トンネル顕微鏡により明らかになったのは、巨大生体分子はただその溶液濃度が臨界値の約 10^{-3} － 10^{-5} mg/ml以下であれば、乾燥した単一の分子の状態で堆積されることである。これより高濃度での乾式方法では、静電噴霧法では多数を占めるものであるナノクラスターは、図15Aで図示するように不透明な多孔質のフィルムを形成する。

乾式静電噴霧法により製造されたフィルムの蛋白質分子は、その機能的活性を保持する。表1に掲げられたデータは、静電噴霧法により製造された種々の蛋白質からなる微小資料は、従来の乾式方法により製造されたこれらの蛋白質のフィルムに対して、特定のリガンドにおいて同じレベルの機械化学的反応を見せることを指し示す。静電噴霧の堆積における蛋白質分子についてのその他の機能的特性

の保持は、実施例3で説明される。同様に、図12A、12B、18では西洋ワサビのペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼの酵素の活性を説明する。

実施例4では、静電噴霧された蛋白質の抗原としての特性の保持について説明する。

表 1

静電噴霧法と従来法（ガラス表面上で蛋白質溶液を乾燥させたもの）とによって製造された種々の架橋結合された蛋白質のフィルムについての特定リガンドに対

しての機械化学的効果の比較

蛋白質	リガンド ¹	乾式試料の効果 ² %	静電噴霧法における堆積物資料の効果 ² %
膵臓 トリプシン	プロフラビン 塩基	+69 +23	+72 ; +72 +37 ; +38
アビジン	ビオチン	-51	-41 ; -48
シトクローム-C (馬)	亜ジチオン酸塩の 還元物	-30 ; -50	-41 ; -49
リゾチーム (卵)	N-アセチル- D-グルコサミン	-7.7 ; -8.7	-6.3 ; -3.5
ヘキソキナーゼ (イースト菌)	グルコース	+31 ; +38 ; +44	+44
アルコール デヒドロゲナーゼ (馬の肝臓)	NAD	+3.5 ; +6.2	+2.7 ; +7.4
α -ラクト アルブミン	Ca^{+2}	+240	+370
コンカナバリン A	Ca^{+2} , Mn^{+2} α -D- mannopyranoside	+10 +11	+6 +4
膵臓 RNAse	3'-シチジン ーリン酸	+4.0	-3.4
3-ホスホグリセリン 酸キナーゼ (イースト菌)	Mg-ATP	+13	+16

1 各々のテストにおいてのリガンド濃度は既知の結合定数の5～10倍をこえる。

2 個々のリガンドの結合により誘起される蛋白質フィルムにおける等尺性張力の相対変化を表す

蛋白質を堆積させるための最高条件は個々の蛋白質によって変化するが、ほとんどの水溶性蛋白質で以下の条件において満足すべき結果が得られることが判明した。蛋白質濃度 $1 - 10 \text{ mg/ml}$, 砂糖またはトレハロース $25 - 40\%$ (乾燥蛋白質、 w/w)、乾燥蛋白質に対して $10 - 15\%$ のグリセリン、 $100 - 20 \text{ mM}$ の β -メルカプトエタノールという条件である。静電噴霧法用に製造された蛋白質溶液の導電率は、 500 マイクロジーメンズ/cm を越えるべきでない。さもないと、堆積の進行が非常に遅くなり、またミクロンサイズの毛管先端が必要となるからである。通常、蛋白質分子の安定性が損なわれない限り pH の調整は必要でない。噴霧する前にすばやく β -メルカプトエタノールを加えるべきである。以下の噴霧条件は、機械化学的試験用の単一の蛋白質微小試料を製造するための標準的なものである。相対湿度 $10 - 40\%$ 、試料ホルダから毛管先端までの高さ； $10 - 14 \text{ mm}$ 、毛管電圧 $+2 - 3 \text{ kV}$ 、コリメータのリング電圧 $+(0.5 - 1.5) \text{ kV}$ 、電流の合計 $5 - 10 \text{ nA}$ 、試料を流れる電流 $3 - 7 \text{ nA}$ 、単一の厚さ $1 - 2$ ミクロンの蛋白質フィルム (横 $0.2 \times 0.2 \text{ mm}$) における堆積時間の合計は $3 \sim 15$ 分かかるが、これは蛋白質濃度に依存する。

毛管を流れる総電流を低く維持することが、全パラメータの中で最も重要であると考えられる。図 18 A、18 B で説明するように、電流を $10 - 100 \text{ nA}$ 以上にするとアルカリ性ホスファターゼの比活性 (specific activity) を顕著に阻害する。同様に低電流は効率の観点からは有効である。高電流下では、遮蔽物の孔の周りに形成される過剰な空間電荷によって、帯電したクラスターを孔からの反撥し、コリメータ、遮蔽プレート上に堆積される帯電クラスターの量を増加させる。

複数成分からなる試料を静電噴霧法で製造する条件は、効率よくロスが無いように、高い流量でかつ高い電流で行われるため、上記とは著しく異なる。基質の堆積を大きく変更させることができるその他の条件は、溶媒 (例えば、蛋白質または DNA 溶液にグリセリン $10 - 30\%$ を加えると、基体-毛管間の距離が長く、かつ低湿度においてさえ多孔質フィルタ上に湿式堆積を可能にする)、濃度、

温度、湿度、及び基体である。

更に、乾式静電噴霧により達成されるより速い乾燥は、損傷から蛋白質を保護することを助け、トレハロース、ショ糖、その他の炭水化物、その他のポリオールのような保護試薬を加えることは、損傷及びまたは乾燥による非活性化を保護するものである。低電圧、低電流、調節された湿度という穏やかな条件で静電噴霧する場合、ショ糖の存在は、静電噴霧に使用される同じ溶液から同じ基体上にアルカリ性ホスファターゼ (AP) を直接乾燥させる場合に比べて、APの活性を保護する。穏やかな条件下で静電噴霧により堆積されたAP酵素の比活性は、初期の酵素溶液と同程度であることが判明した。静電噴霧の過程で生成されるラジカル、活性酸素、その他の活性な化学種、による損傷を抑止するために、ラジカルスカルベンジャー及び酸化防止剤を、保護試薬として加えることができる。ヘキサキナーゼに存在するような機能的特性に対して重要である遊離メルカプト基原子団を持つ蛋白質にとって、静電噴霧される溶液のメルカプト基原子団の酸化を抑止させる薬剤を減少させるβ-メルカプトエタノールの存在は、静電噴霧堆積された蛋白質フィルムの特定リガンドの結合における機械化学的反応の上昇から判断する限りでは、相当に良く機能的特性を保持させる結果となることが判明した。同様にβ-メルカプトエタノールはラジカルスカルベンジャー及び酸化防止剤として働くことができる。このように、この薬剤を加えることは、メルカプト基原子団を持たない蛋白質に対しても有効である。

更に、本発明の方法において、例えばグリセリン、ショ糖、トレハロース等の炭水化物、ポリオールのような保護試薬は、乾燥中に生体分子を損傷から保護するのに加えて、堆積された試料フィルムの、特に蛋白質において生体分子の充填密度を減少させることもできる。これらの保護試薬の添加物は、水溶性及び不揮発性である。乾燥した生体分子は架橋結合された後、水溶性の不揮発性添加物は洗い流され、そのため、試料中に追加の孔とチャネルが作られる。このようにして、架橋結合された試料フィルムの充填密度が減少し、リガンドの試料フィルムへの浸透性が向上する。このようなフィルムは、より大きな分子量、より大きなサイズの特定リガンドを用いるテストにおいてより効率的である。

充填密度の減少、及び生体分子の試料フィルムにおける浸透性を向上させるそ

の他の方法は、高濃度の生体分子溶液における乾式静電噴霧法で使用され、結果として微小クラスタの形態で生体分子が堆積される。堆積された微小クラスタのサイズは、生体分子及びその溶質濃度に強く依存する。図15Cで説明したように、静電噴霧法により堆積された微小クラスタからなるフィルムにおける内部拡散は、同じ蛋白質の乾式法によるフィルムよりも、非常に速くなる。その理由は大きな粒子間のチャンネルにリガンドが容易に浸透するからであり、そして粒子間への拡散速度は、均質なフィルムの場合と同じレベルまで遅くなる。

上で説明したように、大きなリガンドは、低い充填密度を持つ試料フィルムに浸透しやすいと考えられるが、堆積された生体分子層の厚さを薄くすることは試料フィルムにおける拡散限界を減少させる主たる方法と考えられている。適切な物質上に堆積された、或いは独立した生体分子の単層は、いかなる内部拡散限界からも完全に自由である薄いフィルムの限界であると考えられる。機械的試験に利用するために、このようなフィルムは内部的に架橋結合され、独立で存在させるか、または単層フィルムの移動を制限しないゲルの表面上に堆積させることができる。その他の分析（例えばプラズマ共鳴センサー、免疫定量法テストなどで利用される）では、単層フィルム、または均一に分離された分子を、従来技術の範囲内で適当な物質上に静電噴霧法により堆積させることができるが、架橋結合はしていても、していなくとも良い。

生体分子の架橋結合を可能にするための薬剤は、先行技術において良く知られている（ヘルマンソン他、1991年）。紫外線の照射は、DNA分子に対して利用される。蛋白質分子に対しては、架橋結合された蛋白質の機能的活性の保持に関して利点があるため、グルタルアルデヒドが好適である。グルタルアルデヒドは、蛋白質分子の中に多数存在する遊離アミノ原子団を攻撃し、その変成物は、アミノ基原子団が直接活性部位に含まれていない限り、蛋白質の機能的特性に対する補助作用はない。活性部位上のアミノ基原子団は、アルカリ性における可逆マレイル化(maleilation)、アルカリ性における架橋結合、そしてやや酸性（pH 5 - 6）における蓄積(storage)によるデブロッキング(deblocking)などによりグルタルアルデヒドとの反応から保護されるが、一方、本発明者の研究室では、活性部位中にアミノ基原始団を持つ、リボヌクレアーゼ、単一クローン性の抗体

等の蛋白質においては、アミノ基原子団が保護されていない場合でも、このフィルム上でのアフィニティー分析により確認されているように、リガンド結合が依然として検知可能であることを確認した。しかし、アミノ基原始団を保護することは、より大きなSN比を得るために、蛋白質が、多数の遊離アミノ基原始団または結合部位のアミノ基原始団を持つ場合に有効である。

堆積された生体分子が架橋結合する前に、特定の蛋白質においては生体分子のフィルムを湿った空気または溶液（例えばグリセロール溶液、試料フィルムにおける生体分子に限定した移動性、流動性を与えるためのものであり、溶液に可溶性を与えるためのものでない）に曝しも良い。流動性上昇の効果は、フィルムの蛋白質分子、及びまたは、クラスターを相互に移動させ、フィルムの中の孔を埋め、フィルムの見掛けの不均一性をなくすることができる。この現象は、表面に不規則に蒔かれた大きな丸い石の層における変質に結びつけることができる。大きな石が何らかの騒擾によって相対的に移動可能となると、大きな石は構造的により均一になるように移動する。しかし、蛋白質の均一なフィルムは、リガンド浸透力の減少を犠牲にするが、強度は大きくすることができる。

複数の堆積スポットを形成する従来の方法と比較して本発明による方法は以下のような利点がある。

手動で物質のスポットを直接被着させる方法あるいはコンピュータ制御されたマニピュレータを利用する方法（スタンフォード大学DNAライブラリーの製造法と似ている。シャロン他、1996年を参照されたい）と比較すると

(i) 相当小さいスポットを堆積させることができる。

(ii) 複数のスポットを同時に堆積できるので製造時間を顕著に短くすることができる。

(iii) スポットはどんな形にもできる。

(iv) フィルタメンブレンに堆積させる場合、メンブレンの厚さ全体に亘って物質は分布されずに、表面層として濃縮されるので、光学的な方法によってスポットを見つけ易くなる。

溶液からの電着を利用する方法と比較すると、静電噴霧法による堆積は以下の点で有利である。

(i) 微小試料の堆積にマイクロ電極配列を必要としない。

(ii) 平らで僅かに導電性のある表面を支持体として使できる。例えば、湿った空気中における雲母とガラスの表面は、その上に物質を堆積させるには十分な導電性を持っている。図 5 C は、図 5 A に示す遮蔽プレートを通過する静電噴霧法による湿った雲母表面上への堆積方法の例を示す。

(iii) 溶液に接触する場合に生じる可能性のある種々の物質のスポット相互間の汚染が、種々の物質を連続的に堆積する場合には起こらない。

フォトリソグラフ法に比べて静電噴霧法による堆積は以下の利点がある。

(i) 堆積プロセスにおける工程数が減少すること。

(ii) チップ表面全体が各々の溶液と非接触のため相互汚染が減少すること

(iii) 溶液に浸す時、または溶液から引き出す時、溶液との界面を通して移動するチップの個数は少なくなるため、相互汚染が減少すること。

静電噴霧法による堆積技術には以下の固有の利点がある。

(i) 静電噴霧は従来法では達成できなかった条件下で堆積ができる。例えば極めて低温に冷却された表面上に物質を堆積することができる。即ち、図 7 で説明するように、液体窒素または誘電性流体の存在下で堆積できる。このような低温条件は、不安定な分子の堆積において有効かもしれない。同様に静電噴霧法による堆積は真空下での堆積も可能である。質量分析法でイオンを注入するのと同様の方法によって、帯電した分子・クラスターを真空下で注入することができる。或いはまた、例えば基体を質量分析計の投入口の背後に配置することにより、物質は堆積前に分離され、静電噴霧された溶液の分離された成分が基体の種々の場所に堆積される。これにより、更に堆積物は化学分析に利用できるようになる。

(ii) 静電噴霧で堆積された物質の内部構造は、通常のものとは異なるものとすることもできる。例えば、静電噴霧法により得られた非結晶の蛋白質フィルムは、表面上の蛋白質溶液を乾燥させることにより得られるフィルムと同じくらい高密度に圧縮されず、均質でないこともある。代わりに、蛋白質クラスターから作られる多孔質の物質が、図 15 A に示すように濃縮蛋白質溶液の静電噴霧法による堆積により得られる。このような多孔質フィルムは、このようなフィルム内への物質の浸透が容易となるので、分析の用途において利点となる。

(iii) 本質的にすべての静電噴霧された物質は基体へ向かうため、堆積する物質は容易に調節できる。このような効果は、異なる分子の活性化表面への結合効率が異なる溶液からの生体分子の堆積の場合では得られない。

(iv) 静電噴霧法による堆積は、實際上すべての静電噴霧された分子はマスク上の孔を通過し基体表面上に到達するため、非常に経済的である。

(v) 静電噴霧による堆積は、堆積物の大きさに関して非常に柔軟である。1ミクロンと同じくらい小さいスポットだけではなく、1cmまたはそれ以上の大きさのスポットに対しても、同様の技術を適用することが可能である。

本発明による方法は、極めて少量の蛋白質(0.01-1マイクログラム)からバイオセンサの感応素子を製造するために使用される。このことは、蛋白質フィルムの特性的変化によって蛋白質分子の生体特性を機械化学的方法でテストする場合に特に重要である。その理由は、マイクログラム単位の蛋白質は、電気泳動のような一般的な分析規模での蛋白質精製によって、通常容易に手に入れることができるためである。この方法は、他のタイプのバイオセンサ、例えば酵素電極、MOSFET化学センサ、蛋白質の質量または光学的特性的変化に基礎を置くバイオセンサ等のために蛋白質試料を製造するために利用することもできる。一般に、生体特性のある分子からマイクロ試料の製造する本発明の方法は、自然界における生体分子の生体特性と、信号処理能力および最新の小型の集積化されたチップと、を結合する新しい方法を提供する。

このような試料フィルムの製造例は、図6で説明され、静電噴霧法による堆積は、固定化された蛋白質の単一の試料フィルムを得るために利用され、このフィルムは、蛋白質の生体親和性の機械化学的検査に使われる。本発明による方法は、数マイクロリットルの水に溶けたマイクログラム以下の蛋白質から蛋白質試料の製造を可能にする。容易に試料の剥離をさせるためには、図6に示すように補助層を、導電性がある基体に予め堆積させることである。

試料フィルム堆積物を使用する直接結合検知法には、プラズマ共鳴(即ち、商業的に利用可能な楕円反射顕微鏡)と走査型プローブ顕微鏡(力顕微鏡は基体表面上の大きな蛋白質分子の配列に対するリガンドの結合を発見するために使用可能なのに対して、トンネル顕微鏡は、基体表面上の基質に存在する捕捉的なオリ

ゴヌクレオチドに対してのDNAプローブの結合を検知するために使用することができる) とが含まれる。

本発明による方法は、これらのすべての方法において複数成分の試料製造と同じように必要な試料の大きさを著しく減少させる方法を提供する。例えば、走査型プローブ顕微鏡は、蛋白質、または基体表面上にマトリックス状に堆積されたその他の分子における検体の相互作用を発見するための方法として使用できる。そのような方法の1つは、図8に示される。走査型力顕微鏡(SFM) / 原子間力顕微鏡(AFM) は、マトリックスの各々のスポットの弾性と高さとを測定できる。従って、大きな検体(即ち、蛋白質、DNA分子) の分析では、SFM/AFMがプラズマ共鳴と質量変化法のように蛋白質単層の厚さの増加により直接検体の結合を発見するために使われる。小さな検体では、蛋白質堆積物における機械化学的効果を利用することもできる。図8の右側の部分で説明するように、マトリックスの各々のスポット(堆積物) は、被検溶液との接触で増大し、その弾性係数が変化する。種々の特性を持つ種々の成分の応答によって、複雑な複数の成分からなる溶液を分析することができる。

基体上へ種々の物質を所定のパターンにしたがって或いはマトリックス状に大成したものを大量製造するには、個々の物質を堆積した後、複数の孔を有する誘電体マスクまたは光学マスクを所定の距離だけ移動させることにより達成される。この移動距離は、遮蔽プレートの孔の間隔より小さいことが好適である。このようにして、スポットのパターンを、複数成分のマトリックス配列として形成することができる。図9に示すように、複数成分のマトリックスにおける1個のスポットがマスクにおける各々の孔の下で同時に製造できるように、異なる溶液が各々堆積された後、マスクまたは基体は、XYスキャナにより移動される。異なるスポットとして堆積されるため別々の毛管に入れられた溶液AからEは図9に示されるが、一方、同じ装置を用いて同時に非常に多数の単一成分の試料を製造することもできる。例えば200000スポットのパターンを、この方法でマスクの孔を通過し静電噴霧法の静電集中により標準の郵便切手大(約2cm×2cm)のエリアに堆積できる。図32、33は基体とマスクとを相対的に移動させるための2種類の装置について説明する。図32ではマスクは可動ステージに装着さ

れ、図33ではマスクは各々がスライド内で移動可能な一組のプレートに装着される。

このように本発明による方法は、非常に高価、または入手困難な物質を使用せずに化学検査に使用するための数千の蛋白質、DNA試料を同時に製造させることを提供する。 $10^{-7} \sim 10^{-11}$ g程度の微量の物質から各々の静電噴霧されたスポット（堆積物）を製造することができるからである。同様に静電噴霧法は、既存の免疫酵素法をマイクロスケールに変更することもできる。例えば、抗原Xを、共有結合その他の強力な結合能力がある基体上に数千以上のスポットとして分布させることができる。余分な抗原を洗い落とした後、各々のスポットは、血清中の抗原Xに対する抗体の存在を発見するために利用できる。結合した抗体は、標識酵素の抗体として間接的にまたは直接的に検知することができる。走査型力顕微鏡、プラズマ共鳴のような、スポットの部分における蛋白質物質の量の変化を検知できる直接法を利用することもできる。結合した抗体が間接的に検知された場合、呈色酵素反応では、不溶性の化学的発光物質や蛍光物質を効果的に使うこともできる。簡単な試算では 10×10 ミクロンの大きさのスポットにおいては各々のスポットに抗体分子が $10^4 \sim 10^6$ だけあれば光学顕微鏡で測定可能である。このようにして、 $10^3 \sim 10^6$ の感応素子が1マイクログラムの抗体から作ることができる。この方法のその他の利点は分析速度の促進である。大きい物体に比べて小さい物体の周りにできる非攪拌層は一層薄くなるため、結合および洗浄の際の拡散限界が、小さい試料において著しく減少するからである。

その上、本方法は、複数成分のマトリックス、即ち、基体上に空間的に分配される種々の蛋白質、DNA、及び、その他の分子を製造するため、及び、基体上でパターン化された種々の抗原における配列における結合を検知するために、利用できる。種々の蛋白質のスポット配列によって、生物学的液体、自然抽出物等の複雑な混合物における複数成分を分析することができる。種々の特性についての種々のセンサの反応を同時に行なえることは、特性と安定性の必要性を著しく減少させることは、化学分析では良く知られている。

免疫分析のための微小の複数分析テストの製造は、現存する方法を変更して静電噴霧法を利用する、その他の例である。最新の方法では、酵素反応による蛍光

物質、発光物質の着色により視覚化されてプラスチックの小瓶上に抗原-抗体-標識を付けられた抗体のサンドイッチ構造が観察される。本発明によるELISAの小改良版は、基体上に配置された種々の抗原の配列を持つ。各々の抗原のその特有な場所は、その基体の位置によって決定される。第2の抗原に対する抗体が溶液として存在する場合、マトリックスの各成分は、酵素と共役結合された抗体で標識を付けられることができ、そして基体に酵素を加えた後で容易に視覚化され、結果として不溶性の着色または蛍光の生成物となる。このような複数抗原のマトリックスを用いることにより、一回の分析で生体溶液中における多数の抗体を同時に確認でき、アレルギーの確認、大量の微生物及びウィルス感染性物質などに対する患者の免疫性を検査するためのスクリーニングを行うことができる。

さらに他の用途においては、本発明による方法を用いて、複数のDNAプローブを同時に複合化 (hybridization) させるための試料を製造することができる。種々のオリゴヌクレオチド、DNAの断片からなるスポットのマトリックスはガラス、フィルタ、その他の適切な表面上に製造することもでき、生体種のルーチンワークとしての同定、器官の免疫耐性、遺伝分析、そしてドット・プロット (dot blot) テクニックのその他の応用のような従来の方法 (ハメス他、1987年) で使用できる。ガラス或いはナイロンフィルタ上に静電噴霧された λ -DNAの分子が、ビオチン標識付けされた λ -DNAプローブと複合化する能力を保持することは、実施例7、8に付き上述したところである。

同様に複数成分の試料は、本発明の方法によって、物質の生物学的特性における物質の迅速なスクリーニングのために製造される。例えば、異なる有機体、または生物学的混合物は2次元配列に配置される。その後、できあがったマトリックスを、細胞培養基または細菌培養基ゲルの表面と接触させてこれらの物質をマトリックス中に浸透させる。細菌培養基中の細胞の反応では、幾つかの変化、即ち形態変換、成長阻害地帯等が観察される。例えば、良く知られた抗生物質を含むマトリックスは、最も効果的な処理方法を選択できるように感染性微生物の種々の抗体への感応を検査するために使用される。同様に本発明による方法は、種々のマトリックス成分から酵素阻害物質を素早く特定するために使用される。飽和した酵素を含むフィルタにマトリックスを接触させた後、酵素阻害を、マトリッ

クスと飽和酵素フィルタとの接触領域全面に亘って酵素活性が分布するように組織化学反応 (histochemical reaction) を使用して見つけることができる。例えば、市販の薬剤のスポットを含むマトリックスの大量生産は、薬剤と多数の鍵酵素との反応を検査することによりこれらの薬剤の補助作用の可能性を確かめるのに便利な方法を提供する。

本発明による方法は、現在、非常に注目を浴びている分野であるコンビネーショナル・ライブラリ (combinatorial libraries) の製造に都合良く使用することができる。コンビネーショナルライブラリを設計するその他の技術と対照的に、2次元ライブラリの化合物は、配列の位置により識別できるため、標識をつけることを要しない。静電噴霧法の堆積技術を使用するこのようなライブラリの製造は、表面が化合物の構造の特定成分 (N-またはC-endポリペプチド等) と強い結合 (共有結合) ができるような表面活性化と、静電噴霧される全てのヌクレオチドまたはアミノ酸、表面の非活性化、余分な非結合の混合物の洗い流しと、オリゴヌクレオチドまたはペプチドにおける末端基群の活性化を含むものである。このような一連のステップは、ヌクレオチドまたはアミノ酸の残留物が連鎖に導入される数だけ何回も繰り返される。

従来技術で利用することができる既知の技術を使用してこのようなマトリックスを製造する場合と比較して、本発明の方法による静電噴霧法による堆積は、プロセスを非常に単純化でき、プロセス時間を短縮できる。例えば、両方法とも、図10A-10Fに示す6個の一連のマスクを使用して、6-merのヌクレオチドの組み合わせについての全ての可能性を含む16384成分のライブラリに、連続的にヌクレオチドを空間的に広く堆積することができる。このようなマトリックスの各層は、4つのヌクレオチドのうち一つを堆積した後、各マスクを90度回転させることにより得ることができる。従来法によると、各ヌクレオチドを設けるには以下のステップが必要とされる。(i) マスクの孔を通して基体の特定の場所を光学的に活性化する (図10A-10Fの白い部分で表わされる)、(ii) 変成させたヌクレオチド (アミノ酸) 溶液と反応させる、(iii) 余分な反応物を洗浄する。このような湿式化学法的全サイクルを、各々新たなヌクレオチドを設ける度毎に繰り返す。

これとは対照的に、本発明の方法では、全ての4つのヌクレオチド（または20のアミノ酸）を空間的に広く表面上に分布させ、その後、単に湿式化学法によって層中の全てのヌクレオチド（アミノ酸）を結合させる。例えば、図10Aに示されるマスクは、1つの四角い大きな孔（白く表わされる部分）を持ち、6-merヌクレオチドのコンビネートリアルライブラリにおける最初のヌクレオチドを堆積する第1のサイクルでは、アデノシン・ヌクレオチドがこの1つの大きな四角い孔を通過して基体上に静電噴霧される。その後、他の3つのシトシン、グアノシン、チミジンのヌクレオチドを堆積する毎にマスクを90度回転して、種々のヌクレオチドの堆積物に相当する基体の4象限毎に最初のヌクレオチドの層を生成する。堆積されたヌクレオチドの化学結合の後、ヌクレオチドの次の層は、他のマスクを使用して堆積され、最初のマスクを用いた場合と同様にマスクを90度ずつ回転して各々のヌクレオチドを静電噴霧する。図10Aから10Fの一連のマスクがそれぞれ連続的（順番は問わず）に使用することにより、ヌクレオチドの組み合わせで可能なもの全てを生成できる。図10A-10Fに示したものと類似する光学マスクも帯電したヌクレオチドの光導電性の誘電体基体上への堆積に使用できる。

全ての4つのヌクレオチドを堆積して層とした後、オリゴヌクレオチド末端基へのヌクレオチドの化学的結合を行うが、温度を上昇させることによって飽和状態とした溶液蒸気の雰囲気中に堆積物を置くか、またはその他の既知の化学反応を活性化させる方法を用いることによって活性化させた反応物にヌクレオチドを結合させる固体化学の従来法を使用して行われる。このようにして、静電噴霧の堆積は、オリゴヌクレオチドのマトリックスの合成を少なくとも4倍に促進させ、そしてペプチドのライブラリの合成も幾分程度が大きくなるように(約20倍に)促進させる。このようなライブラリの大量製造は、遺伝子分析、新薬の調査等に必要とされる。特に、重なりあったDNA断片のこのような組み合わせのマトリックスの複合化によるDNAシーケンシングは、オリゴヌクレオチドを組み合わせたマトリックスの最も興味深い応用の一つである。

更に本発明は、静電噴霧された荷電粒子の噴霧物が電界場によって堆積すべき部分に導かれる装置を意図するものである。

図24は、電氣的に帯電した粒子の噴霧物が排出される毛管52と、保護リング20と、荷電粒子の噴霧物を囲い込み、導くのに役に立つ格子状遮蔽プレート70と、及び堆積物が作られる基体（図24では参照不可）を支持する基体ホルダ69とを内部に含む、静電噴霧チャンバー100を有する装置を示す。このホルダ69は、ドライバ205により駆動されるステップモータ200により回転される磁石201、202によって回転される軸受け及び別の磁石（図24では見えない）を有することが好適であり、さらに、これらの磁石201、202を、ドライバ205により駆動されるステップモータ200により回転することが好適である。この磁石の駆動装置は、チャンバー100とは電氣的に隔離され、そして振動を減衰させる。

静電噴霧チャンバーの横には、静電噴霧チャンバー100を通過して顕微鏡302に至るようにレーザ300がレーザ光線301を照射させるために透明な窓101及び孔（図27では見えない）、またはプラスチック窓が付いた格子状の遮蔽プレート70を有することが好適である。これにより、毛管52から放出された荷電粒子の「たいまつ状のもの」を観察できるようになる。このレーザ300は、Ne-Arレーザであり、顕微鏡は5倍から10倍の倍率があることが好適である。

注入器400は、チューブ402によってチャンバー100に繋がっている。これは、荷電粒子の噴霧物が発生するように、溶液を注入して使用される。

タンク500からの乾燥空気（また他のガス）の供給は、チューブ502と流量計503を通りチャンバー100に流れる。湿度計505には、チャンバー内に配設されたセンサ506を具えることが好適である。この湿度は、噴霧物の粒子、典型的には水溶液の液滴の蒸発率を調節するために制御されるべきである。湿度は、典型的には約10-30%に保たれるべきである。更に、この図示されたタンク500では、シリカゲルによって乾燥空気を得ることができる。流量は、標準的には200-500 mL/分である。

デュアル電源700は、下記のようにチャンバーの内部の部品にキロボルトの範囲の電圧 U_1 、 U_2 を印加する。電流は、それぞれナノアンメータ702及び705で測定することが好適である。電圧 U_1 は保護リング20に与えられ、電圧

U₁は毛管52に印加される。或いはまた、保護リング20及び毛管52に接続された単一の電源を使用することも可能である。両方とも、毛管52から放出された荷電粒子の噴霧物を反撥するような電位に設定される。

図25は、静電噴霧チャンバー100のより詳細を図示する。このチャンバー100は、ステップモータ200及び磁石201、202が設けられた、底が開放された台110の上に据えられている。これらによって対応する磁石111、112を駆動して、試料ホルダ69が装着されたベアリング113の回りを回転させる。

保護遮蔽プレート30（図29A、29Bにも図示される）は、試料ホルダ69上に立ててあり、格子状遮蔽プレート70（図27にも図示される）を支持する。これは、4つのアクリル製チューブの脚と、ポリスチレン製のリング32と、中央に孔35が開いているテフロン製の天板31とを含むものが好適である。天板31は、図示するようにやや変形していて、下方にへこみがあるものが好適である。

保護遮蔽プレート30の真上には、格子状遮蔽プレート70の内部に配置された収束リング40がある。この収束リング40は、中空であり、図24に示すようにその上端部は乾燥空気チューブ502に繋がっている。この空気は、部分的にシリコン製チューブ43にぴったりと覆われたステンレススチール製チューブ42を通り、ポリエチレン製継ぎ手44を通り、中空のシリコン製チューブリング45に繋がることが好適である。より小さいテフロン（登録商標）製チューブ46が、このリング45から中央の開放部に向けて集まっている。

銅製リング47が、中央の開放部に配置され、保護遮蔽プレート30の孔35の上に配置されることが好適である。このステンレス製チューブ42を、電源（図25、28には示さず）からの電圧U₁によって帯電させるが、この電圧はテフロン製チューブ46の1つを通る導線を経て印加することができる。この電圧U₁は、荷電粒子を所定の方向に向けるための補助手段として利用しても良い。この電圧は、1つの鰐口クリップを通して印加されるものとして示されているが、これは単に例示的なものである。

後述するように、銅製リング47上の電圧U₁は、試料ホルダ69（及び、こ

れによって支持される基体、図3、4を参照)の電圧と、電圧 U_0 が印加されている毛管52の電圧との中間の値とするのが好適である。

この格子状遮蔽プレート70は、1000ミクロンの孔のポロプロピレン製遮蔽用布で編み込まれたものとするのが好適であり、これはフロリダ州、マイアミレイク、スモール・パーツ社の商品名CMP-1000-Aとして入手可能である。この孔は約1.0-1.5mmにすべきであり、この物質は良好な誘電体であるべきである。窓71は、光を通す光学的性質のためにアクリルプラスチック製であることが好適である。図16Aには別のじょうご型の格子状遮蔽プレートが示されているが、これについては後述する。

尚、格子状遮蔽プレート70内部は、ガラス製の毛管52であることが好適であり、毛管ホルダ部品50は図26で最も良く示される。噴霧される液体は、チューブ402(図24で示される)から到達し、そしてニッケルメッキの真鍮製のチューブ53を通り毛管52に達し、そして、引き延ばし形成したガラス製チューブ52のオリフィスから吐き出される。毛管52の孔の外径は30-40ミクロンを越えるべきではなく、外側の表面は親水性に表面処理されるべきである。排出される溶液は、毛管52の孔を通して挿入される高純度プラチナ製導線によって帯電され、この導線には、電源700(図24)から真鍮と鉄製のチューブと典型的な鰐口クリップを経て電圧 U_0 が電氣的に印加される。この保護リング20は、格子状の遮蔽プレート70の上端部近くに配置される単に環状のまたはドーナツ状のものである。

図30は、試料ホルダ台69の部品を示す。上方の部品は、真鍮プレート698に溶接した真鍮製軸受けの上で回転し、真鍮プレートの上にはスペーサ695を介してアクリルプレート693を固定する。駆動磁石111及び112はアクリルプレート693上に据えられる。マスクの組み立て部品691は、ぴったりとプレート693に接合されたアクリル製補助ホルダ692によって支持される。軸受け697とバネ699は、正確な位置決め補助となる。

堆積時の試料ホルダ69の回転は、空気の流量が低い場合において、均一な堆積フィルムを得るために必要である。

図31は、図30に示される試料ホルダ台69に適合する試料ホルダを示す。

この補助ホルダ692は、プラスチックプレート6922上に据えられ、このプラスチックプレートはハンドル6924を有するベース6923上に装着され、試料ホルダを、真鍮プレート698、スペーサ695及びアクリルプレート693によって区画されたエリアに配設する。例えば、図4Aの静電装置581または621、あるいは、図4Bの95のような静電装置への電氣的な接触を行うために炭素ペーストを利用するのが好適である。

図32Aは、本発明の1つの好適実施例を示すものであり、揺動装置が静電噴霧の毛管52を振動、または揺動させるために使用される。この静電噴霧ホルダ50は、往復運動または回転運動のために揺動させるモータ250及び真鍮チューブ53（または毛管ホルダアッセンブリ50の何か他の部品）に連結された機構252によって揺動させることが好適である。この機構252は、チューブに対して直角に配置されている。この機構を適当に設計して、毛管52の先端を基体58の各エリアの上方に同じ時間だけ滞在させるようにするのが好適である。毛管を振動させるその他の何らかの方法も、本発明の範囲内に入る。

また、図32Aの実施例は複数スポットを含むマトリックスを製造するための典型的な構造をも示している。この実施例では、各化合物を堆積した後、試料ホルダ69及び基体58は水平方向XとYに移動する。これらは一般に荷電粒子56の動きに対して垂直である。図32Aの実施例では、軸受け113、磁石201、202、110、112、ステップモータ200、及び図25の駆動体205は使用されない。

この移動は、どんなタイプにすることもできるX-Y平面移動ステージによってなされる。図32Aは、副尺付きのX-動作、Y-動作のマイクロメータヘッド121、122を有する平面移動ステージが、手動で操作されるタイプのものを示すが、この平面移動ステージは、どのような手動タイプのものとする 것도でき、また、例えばステップモータまたはそれに等価なもの、接触スイッチ、回路、またはコンピュータプログラムによって駆動される自動的なものであっても良い。磁石115を用いて、磁石115と基体58との間に配置された電極102付きの平面移動ステージ上に試料ホルダ69を固定するのが適である。

また、本発明は、上述したところとは異なる幾何学的配列に堆積物を生成する

ものでもある。例えば、X、Y平面移動ステージの代わりの θ 、r平面移動ステージすなわちローテータを用いて異なる半径の円に沿って配置することもできる。

この平面移動ステージは、マスクの孔が基体の上方において新しい位置に移動するように基体を移動させる。新しい堆積エリアには、新しい物質を堆積させることができる。このようにして種々の物質のマトリックス状の堆積物を、行および列に沿って配列することができる。

図32Bは、図32Aの円形の部分を拡大して、マスク62、マスクの孔60、基体58、堆積物64を示すものである。断面図に示されるマスク補強ビーム61は、マスク62の上面に固着された細条とするのが好適であるが、ハニカムのような格子状のもの等でも良い。スペーサ6258は、マスク62と基体58の間に設置される。このスペーサ6258は、マスク62が基体58の表面上でどの方向でも回転できるように、小さな球体であることが好適である。

図33は、マスク移動装置の他の実施例を示すものであり、第2プレート126上にX方向に移動可能に配置した第1プレートを具え、この第2プレート126はベースプレート127上でY方向に移動可能である。カム123、124の形態のX、Y方向への揺動装置は、プレート125、126とにそれぞれ軸受けされている。これらのカムが回転すると、これらのプレートが動く。このマスク移動装置は、図25の試料ホルダ69の回転台上に設置することもできる。

図34は、回転試料ホルダ台69の直径が大きいこと、堆積がチャンバー100の片側（図34の右側）で行われるという点を除いては図25と似ているチャンバー100を示す。一方、このマスク62は、静電装置（図34では示さず）に接続されたコロナ電極からの逆極性イオン856の放電流によって荷電を注入するようにしている。この逆極性イオンは、荷電粒子とは反対の極性を持つためこのように呼ばれる。例えば、図34は、逆極性イオンが負の極性であるため、誘電体の基体58上に堆積される荷電粒子は、正の極性であることを示す。このコロナ電極は、微小電極の配列を含むものであることが好適である。

毛管52からマスク62への荷電粒子56の流れを妨害するコロナ電極850からの電場を防止するためには、このコロナ電極850は、例えばアースファラ

デーシールド 8 4 0 のような保護シールドで囲むのが好適であり、このシールド

は接地することができる。このシールド 8 4 0 の底は開放されており、マスク 6 2 の近くに配置される。カウンタ電極 8 4 2 はテーブル 6 9 の直下に配置するのが好適であり、これはファラデー円筒を完成させ易く、基体の一部分を金属で囲むものである。しかしながら、このカウンター電極 8 4 2 は、アースされずに、その代わりに、逆極性イオン 8 5 6 を引き付け、そして下方のマスク 6 2 に移動させる電圧を印可する静電装置（図には示せず）に接続するのが好適である。

第 2 カウンター電極 8 4 4 は、毛管 5 2 の下方の、テーブル 6 9 の下側に配置するのが好適であるが、テーブル 6 9 の軸線に対して第 1 カウンター電極 8 4 2 とは反対側に設ける。第 2 カウンター電極 8 4 4 は、静電噴霧の毛管 5 2 と同様に第 1 カウンター電極 8 4 2 とは反対の極性とするのが好適である。

図 3 4 の装置では、マスク 6 2 に到達するカウンター電極からの電界場を防止するために、回転テーブル 6 9 は金属製にすべきではない。この回転テーブル 6 9 は、プラスチックまたは雲母のような誘電体からできていることが好適である。

本発明を一般的に説明してきたが、本発明は図に示される以下の実施例を参照してより容易に理解できるであろう。ただし、これらは本発明を限定するものではない。

実施例 1

0. 0 1 % のウマミオグロビン（シグマ社、セントルイス）の水溶液を、多数の孔がある単繊維の生地を通過させてガラスの導電性の表面上に静電噴霧した。この導電性ガラス表面は、顕微鏡スライドガラスを炉内で SnCl_4 蒸気で処理することによって準備した。+ 5 k V を静電噴霧の毛管に印可し、そして、ポリプロピレン繊維をマスクとして使用し、導電性ガラス表面上に堆積させるために静電噴霧を静電集中させた。図 5 A と 5 B とを比較すると明らかなように、繊維の孔の大きさは 2 2 - 2 3 ミクロンであるのに対して、ミオグロビン蛋白質は 5 - 7 ミクロンの大きさのスポットとして堆積されており、静電レンズ効果があることがわかる。パターン中の幾つかの失敗したスポットは、所々にあるゴミの粒

子が原因であり、これは遮蔽プレート上に存在することが観察されている。この実施例では、蛋白質を同時に多数のスポットとして堆積できることが明らかとなった。このようにして、約47ミクロンの間隔で離間した多数のスポットで覆わ

れた20 x 20 mm²のガラス基体の場所に、 1.8×10^6 個の蛋白質のスポットが含まれることが判明した。

実施例 2

9種類の異なる色素(0.01%)のメタノール溶液を、テフロン遮蔽プレート(マスク)の孔を通して、多孔質のIMMOBILON-Pフィルタ(ミリポア社)の表面上に静電噴霧した。このフィルタの表面は、ポリエチレングリコール-8000を15%、10 mMのMgCl₂、グリセリン15%の溶液に浸すことによって僅かに導電性を持たせた。静電噴霧の堆積は、4 mm間隔で直径0.5 mmの100個の孔付きテフロンマスクを通して毛管に+7 kVを印可しておこなった。各溶液を0.5マイクロリットルずつ堆積した後、マスクを約0.6 mmだけ移動し、そして他の色素を堆積した。堆積された色素のスポットのマトリックスを含む多孔質のIMMOBILON-Pフィルタの小片を、図11に示す。この実施例は、本発明の方法によれば、基体上の複数の物質を所定のパターンにしたがって堆積して、同時に多数のマルチ分析用試料及びライブラリーを製造することができる。

実施例 3

この実施例で使用した静電噴霧の条件は、実施例1で使われるものと似ている。、蒸留水で透析された、2種類つの市販の蛋白質、ペルオキシダーゼとアルカリ性ホスファターゼ(シグマ・ケミカル・カンパニー社、セント・ルイス、モンタナ州)を、ポリプロピレンマスクの孔を通して、少し湿ったニトロセルロースフィルタの表面上に静電噴霧した。静電噴霧によって所定のパターンに堆積され蛋白質が、その機能的特性、即ち、自然リガンドとの固有の結合能力および酵素反応を保持するが明らかとなった。

静電噴霧後、堆積した酵素のパターンはメンブレンフィルタの表面上では目に見えない。しかしながら、この酵素のパターンはペルオキシダーゼを堆積させた

メンブレンフィルタを標準的なペルオキシダーゼの基体（3, 3'-ジアミノベンジジン、略称DAB、モンタナ州セント・ルイスのシグマ社から入手可能）に浸すことにより、目で見ることができるようになり、結果としてペルオキシダーゼ反応における茶色の不溶性生成物の形態となる。不溶性生成物の存在を示すスポットの配列は、図12Aで示される。

同様に、アルカリ性ホスファターゼをその上に堆積したメンブレンフィルタを、標準的なアルカリ性ホスファターゼ基体（5プロモ-4クロロ-3インドリン酸／ニトロブルー・テトラゾリウム基体のシステムキット、シグマ社、セント・ルイス、モンタナ州）に浸し、結果としてアルカリ性ホスファターゼ反応による青色の不溶性生成物が生成され、そしてこのパターンは図12Bに示すように視覚化された。この結果は、静電噴霧堆積後でも、アルカリ性ホスファターゼ及びペルオキシダーゼの酵素活性が維持されることを示すものである。

実施例 4

種々の抗原（ヒト及びウシ血清アルブミン、オボアルブミン、ヒトヘモグロビン）を、複数の孔を持つマスクを通過して湿ったIMMOBILON-Pメンブレンフィルタ上に、静電噴霧で堆積した。これらの蛋白質抗原の各々を堆積した後、このマスクを1.1mmずつ移動した。全ての4つの蛋白質抗原の堆積後、このメンブレンフィルタを、37℃で15分間乾燥し、0.05%のTween-20、1%の鶏のアルブミン（オボアルブミン）PBS溶液（10mMのリン酸ナトリウム緩衝剤、pH7.2、0.9%のNaCl）に浸すことによってブロックした。ブロックした後、このメンブレンフィルタを、ヒト血清アルブミンに対するヤギ抗体溶液（シグマ社、1:1000で希釈）に1時間浸した。その後、このフィルタをPBS緩衝溶液で10秒間ずつ2回洗浄し、アルカリ性ホスファターゼ（シグマ社、1:3000で希釈）で標識されたヤギに対するIgG抗体の溶液に浸した。PBS中の余分なヤギに対する抗体を洗浄した後、酵素で標識されたスポットの堆積をアルカリ性ホスファターゼ基体の溶液に浸すことにより、実施例3で説明したように不溶性の生成物を産出することによってこのフィルタが認識される。図13は、このマイクロELISA分析法を利用することによって

得られるパターンを示すものである。予想されるように、ヒト血清アルブミンの堆積に相当するスポットは、最も強烈な色である。オボアルブミン、または、おそらく、ウシアルブミンに対する幾つかのヒトアルブミン抗体の交差反応性のため、そしてヒトヘモグロビン試料中のヒトアルブミンによる汚染のために、ウシアルブミンまたはヒトヘモグロビンのように強烈な色が無いもの、のような他の

蛋白質のスポットは、全く見る事ができない。この実施例は、静電噴霧の手順は、蛋白質の抗原としての特性を顕著に変化させないことを示し、そして、複数成分の免疫酵素プローブの大量製造について静電噴霧法の適用を説明するものである。

実施例 5

機械化学的分析用の蛋白質フィルムを、静電噴霧法によって製造した。0.5 mg / ml のグリセリンを含む 2 mg / ml コンカナバリン A (シグマ社、セント・ルイス、モンタナ州) 溶液を、長方形の 1 つの孔を通過して、2 - 5 ミクロンの厚さの高分子導電性補助層で覆われたアルミニウム電極上に静電噴霧した。この補助層は、それぞれ 3 % ずつの 3 つの化合物 (ポリエチレングリコール - 8000、ポリ (アネトールスルホン酸) ナトリウム塩、及びトライトン X - 100) の混合水溶液の薄い層を乾燥させることによって作成した。この蛋白質溶液を、毛管に 4.0 kV の電圧を印可し、33 nA の電流を流し、基体の上方 20 mm に設置された毛管先端から静電噴霧した。堆積は乾燥空气中、10 分間行った。静電噴霧堆積された後、この試料を、15 分間 25℃、25% のグルタルアルデヒド (アルドリッチ社、ミルウォーキー、ウィスコンシン州) 蒸気中で架橋結合した。基体表面上に水滴をかけると、この試料は、5 秒で基体から離れて浮き上がった。図 14 A に示すような、この試料のマイクロ写真を作成するために、この試料を、水滴に入れられ、カバースリップで覆われたクーマッシー・ブリアント・ブルー R (シグマ社、セント・ルイス、モンタナ州) 溶液を用いる処理によって着色した。

図 14 B に示す、馬肝臓のアルコール・ジヒドロゲナーゼ (LADH、シグマ社、セント・ルイス、モンタナ州) のフィルムを、95% のアルギン酸ナトリウ

ム塩(シグマ社、セント・ルイス、モンタナ州)、及び5%の界面活性剤トライトンX-100からなる補助層で覆われたアルミニウム電極上で製造した。5 mg / ml の蛋白質、1.5 mg / ml のショ糖を含むこのLADH溶液は、基体の上方15 mmに設置された毛管から、+4.3 kV、電流30~40 nAで、乾燥空気中で静電噴霧した。このように堆積したフィルムを、28℃、25%のグルタルアルデヒド蒸気によって8分間で架橋結合した。その後、この試料を、0

4 mMのNADH溶液に対する等尺性張力の変化についてのそれぞれの能力を検査した。同様の6~8%のリガンドによって誘起された、静電噴霧の堆積によるフィルム、及び、従来の方法で用意されたフィルムの等尺性張力の増加は、静電噴霧法による蛋白質は、リガンドと固有の結合する機能およびこの結合の結果としてその構造の変化を保持することを示すものである。

これらの実施例は、機械化学的方法によって蛋白質を検査するためには重要である均一な厚さの小さい蛋白質試料を、その機能的活性を失うことなく静電噴霧の堆積によって製造することができることを示すものである。

実施例 6

乾燥雰囲気中で濃縮された蛋白質溶液からの蛋白質の堆積は、結果として多孔質構造の形態になる。図15Aは、研磨された金の電極上に堆積されたヒトヘモグロビンフィルムの原子間力顕微鏡(AFM)による像を表わすものである。この蛋白質は、他の添加剤を加えていないヒトヘモグロビン0.6 mg / mlを含む水溶液から静電噴霧した。堆積は、基体の上方20 mmの距離に設置された毛管に+5.3 kVの電圧を印加し、12 nAの電流を流し、溶液の流量100 n l / 分として、乾燥空気中で実行した。図15Aに表わされるこの像は、約300 nmの大きさまでの蛋白質クラスタの存在を示すものである。湿った空気(室温で20分間、100%の相対湿度)に曝すと、結果として、大きなクラスタが消滅し、図15Bで示される画像の黒い構造物として観察される細い「チャネル」がある平坦な表面の形態となる。図15Cは、静電噴霧で堆積された蛋白質フィルムの浸透性が高いものであることを説明するものである。この実施例では、固

形状の色素の小さい小片を、静電噴霧で堆積されたフィルム及び乾燥させたフィルム両方の表面上に乗せ、そして、これらのフィルムを湿度100%のチャンバーに入れた。水の存在下、色素分子はこの蛋白質フィルムに浸透し、色素の各小片の周りに拡散する同心円状の色の場所を形成する。図15Cに示すように、この色素の拡散は、従来法である蛋白質溶液を乾燥させることによって作成されたフィルムに比べて、静電噴霧で堆積させたフィルムでは何倍も速く進行する。この実施例は、静電噴霧の堆積による製造が、溶液から乾燥させる場合には均一に蜜実なフィルムを形成する物質から新しい多孔質の物質を作成することを、説明するものである。また、多孔性、即ち、溶媒蒸気を含む雰囲気中での「焼成(baking)」による堆積後の静電噴霧で堆積されたフィルムの特定リガンドに対する浸透性を、調節する方法をも説明するものである。これによって、クラスタ内での蛋白質分子の相対間隔を広げることができるようになる。

実施例 7

DNA 0.5 μ g/ μ l を含む λ -DNA 貯蔵溶液 (ニュー・イングランド・バイオラボの製品) を水で2倍に希釈し、5分間煮沸することによって変性した後、水で急冷した。この溶液 10 μ l を毛管に入れ、その内の 1 μ l を、電極として毛管に入れられたプラチナの導線を使用して電圧 +4.9 kV、電流 40 nA で静電噴霧した。堆積は、長方形の孔 (タイプ E-CMP-250、スモール・パーツ社、フロリダ州) を有するポロプロピレンで編み込まれた遮蔽プレート (マスク) を通して、ガラス表面を親水性にさせるためにプラズマ放電で処理されたカバーの表面上に実施した。ガラス表面上での電氣的な接触は、ホワットマン・3M・ペーパーを切り取った濡れたオーリングによって行った。このDNAの堆積を、15分間の紫外線照射によって架橋結合し、0.1%のSDSですすぎ、それから、水で2回洗浄した。その後、このスライドを、0.1M、pH 7.0のホウ酸緩衝液ですすぎ、70mMの無水琥珀酸中に入れ、35%の1-メチル-2-ピロリジノン (アルドリッチ社製) を含む同じ緩衝溶液中で、10分間処理した。その後、このスライドを、ホウ酸緩衝溶液で2分間洗浄し、そして2分間ずつ水で4回洗浄した。シグマ社から入手できる λ -DNA のピオチニレイティ

ド E c o R I 消化物を煮沸し、そして氷で急冷し、 100 ng/ml の最終濃度で複合化溶液に加えた。 1% SDS、鮭の睾丸のDNAから蒸解した $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ の 10% デキストラン硫酸塩を含む4倍希釈SSC溶液を(シグマ社製)、複合化溶液として使用した。複合化は、 62°C 、14時間、自家製のマイクロチャンバーで行った。複合化後、このスライドを2倍希釈SSC溶液で2回洗浄し、そして 0.2 倍希釈SSC溶液で1回5分間洗浄し、その後、 2% BSA、 1% カゼインを含むAP緩衝溶液で30分間、ブロックした。AP緩衝溶液は、 0.1 M のTRIS-塩酸緩衝溶液、 $\text{pH } 7.5$ 、 0.1 M のNaCl、 2 mM のMgCl₂、及び 0.5% のTween-20を含むものである。ブロッキング後、

このスライドをAP緩衝溶液で5分間洗浄し、そして25分間、 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ のストレプトアビジン・アルカリ性ホスファターゼ結合(シグマ社製)溶液中で熟成させた。その後、スライドをAP緩衝溶液で4回洗浄し、そして pH を 9.5 に調節したAP緩衝溶液で洗浄し、実施例3のようにアルカリ性ホスファターゼの標準的な基質溶液に入れた。これらの図12A、12Bで表わしたものと同様のスポットの配列は、ピオチニレイティドDNAハイブリッドの結合のため、DNAのスポットにおけるアルカリ性ホスファターゼの濃縮を指示するものとしてガラス上に現れる。

実施例 8

他の実験では、実施例7で説明したように製造される λ -DNA変性分子を、 20% のグリセリン、 0.01% のプロモフェノール・ブルー色素を含む溶液からナイロンフィルタ(デュポン社の遺伝子スクリーン・ハイブリダイゼーション・フィルタ)上に静電噴霧した。この後者のプロモフェノール・ブルー色素は、噴霧されたパターンを視覚化するために、複合化する前に加えられ、その後、複合化の前処理中に、全ての色素はフィルタから抽出される。堆積は、相対湿度 60% の湿ったグローブボックス内で実施した。このフィルタは、炭素電極を覆う湿ったホワットマン3Mペーパーの上に設置され、その後、このフィルタを、ガラス上のDNAの堆積で使用するものと同様のプロピレンで編み込まれた遮蔽物

で覆った。目的とする2 μ l のDNA溶液を、+ (4.2 - 4.5) kVの電圧、20 ~ 30 nAの電流で静電噴霧した。堆積後、このDNAを75℃で20分間焼成し、0.5 MのNaOH溶液で変性し、0.5 MのTRIS-HCl緩衝溶液、pH = 7.4で洗浄し、そして紫外線で15分間架橋結合した。その後、フィルタに対して、6倍希釈のSSC緩衝溶液、45%のホルムアミド、1% SDS、10%のデキストラン硫酸塩、5倍希釈のDenhardt溶液、100 μ g / mlの超音波振動で変性された鮭の睾丸のDNA、を含む緩衝溶液中において1時間、42℃で複合化事前処理をした。複合化は、上の実験と同様に、200 ng / mlのビオチニレイティド λ -DNAプローブを加えた溶液内で42℃、14時間実施した。複合化処理後は、2倍希釈のSSC緩衝溶液(5分)、0.2% SDS溶液、室温で2回洗浄し、その後、0.1倍希釈のSSC、0.2% SDS

S、62℃で15分ずつ2回熟成した。洗浄後、このフィルタをAP緩衝溶液で洗浄し、2%のウシ血清アルブミン、1%のカゼインの混合物を含むAP緩衝溶液において、室温で1時間ブロッキングし、その後、ストレプアビジンホスファターゼ結合の溶液で熟成させ、そして前の実施例で説明したように、洗浄し、AP基質内で熟成した。図7、12A、12Bで示すものに似ている青みがかったスポットの配列が現れ、 λ -DNAの静電噴霧で堆積された位置が明らかになった。

実施例7、8は、静電噴霧されたDNA分子が、特に相補的なDNA鎖について相互作用を及ぼす機能を維持し、DNAに基づく検査とライブラリーの製造に対する静電噴霧技術の応用を拡大すること、を示すものである。

実施例 9

この実施例では、種々の色素を、空気を利用して水溶液から静電噴霧した。静電噴霧を実施するために、ステンレススチールの針先を、プラスチックのノズルから吐き出される圧縮空気の噴出中に入れた。針には \pm (2 - 5) kVを印加し、反対極性の高電圧電源を金属プレートに接続した。30 x 30 cmの少し湿ったホワットマン3Mペーパーを、金属プレート上に敷き、直径13 mmの円形の

孔の配列を有する1cmの厚さのプラスチックマスクで覆った。空気ジェットを補助とする静電噴霧を、基体への距離0.2~1m、噴霧される溶液の流量0.1~1ml/分で実施した。1つの色素の堆積後、このマスクを少しの距離だけ移動し、次の色素を堆積した。堆積されたパターンは図17に示すものである。これと、静電噴霧のみの使用によって入手されるものとは、より大量の物質によって、より大きな試料（スポット）がより大きな面積の上に、より速く堆積されることだけが相違し、他のスポットでは似ている。この実施例は、純粋な静電噴霧に加えて、複数の孔が付いたマスクを通過する、静電集中、静電濃縮、パターン化の基本的な現象は、荷電粒子、液滴を生成するその他の手段でも使用できることを説明するものである。

実施例 10

30%のショ糖と10%のグリセリン（乾燥した蛋白質重量に基づく）とを含む0.5%の脾臓RNAse（シグマ社、セント・ルイス）を、実施例1で使用

したものと同様の複数の孔を持つ単繊維布を通過させてポリマ支持体上の導電性のアルミニウム層に静電噴霧した。静電堆積は、閉じたチャンバー内で、相対湿度18%、内部直径10ミクロン、10nA、毛管へ+4.0kVの電圧を印加し、10分間行った。実施例1のものに比べて多量の静電堆積された物質は、3次元構造を有する試料を製造する能力を明らかにした。図19Bに示すように、横5-7ミクロン、高さ30-40ミクロンの大きさの蛋白質試料の配列は、図19Aに図示するように、誘電体マスクに互いに近接して形成された孔におけるレンズ効果を使用する本発明による静電噴霧法で製造することができる。

実施例 11

物質及び方法

物質。牛の腸粘膜のアルカリ性ホスファターゼ(AP)、p-ニトロフェニルリン酸塩(p-NPP基体テーブルセット、シグマファースト社)、のトレハロース、ショ糖は、モンタナ州、セント・ルイスのシグマ・ケミカル社から入手できる。その他の全ての塩、緩衝用添加剤は、分析用の品質であった。

静電噴霧用の毛管のデザイン。3つの異なるデザインの静電噴霧用の毛管が、

この研究を通じて試されてきた。図20Aに示す第1のデザインは、毛管の外部表面上に金の代わりに銀層でメッキした「微小静電噴霧イオン源(ウィルム他、1994年、1996年)」に似ている。両端を塞いだガラス製の毛管を、最初に20秒間、減圧下、無電極プラズマ放電(0.01 torr、放電電力10~20 W、パイレックス級のチャンバー内、0.25 L)で表面処理した。このようなプラズマによる清浄化を行った後、このガラス製の毛管を、塩酸(50 g/L)、SnCl₂の酸性化された溶液中で活性化し、水で洗浄し、そして、銀の「鏡面」で覆った(ヤンボリスキ他、1981年)。このデザインは、外部電極付き毛管と呼ばれるものである。

図20Bに示す第2のデザインは、本発明者(モロゾフ他、1993年)の研究室によって説明される静電噴霧毛管の変形である。この毛管の金属電極(タングステンまたはステンレスチールの導線)はガス相には曝されないが、このようにして、高電圧下のコロナ放電の危険を減少させる。この第2デザインは、内部電極付き毛管と呼ばれるものである。

毛管(ブリッジ毛管と呼ばれる)の第3のデザインでは、蛋白質溶液と金属電極との接触が、その間に液体ブリッジを導入することによって完全に回避される。図20Cに示すようにステンレススチールチューブ4の外側の表面を、大きな外部毛管の遠端の内部に曝される電極として使用する。外部毛管5の断面積は内部毛管7のよりも10倍以上大きいため、この外部毛管の導電性は、内部毛管の導電性の100倍を超え、電流のほとんどが大きな外部毛管5を流れることとなるが、一方、内部プラスチック毛管7は蛋白質溶液を供給するのに使用される。

マイクロプロセッサで制御される10 μ Lのハミルトン・マイクロ注入器を組み合わせた注入器ポンプ(コレパーマー社、ナイルズ、イリノイ州)を、静電噴霧の毛管に溶液を供給するために使用した。流量を6~9 μ L/hとし、毛管先端の外部直径は、種々の実験において50~100 μ mの範囲で変化させた。

湿度調節機能付きのチャンバー。酵素の静電噴霧の実験中に湿度を調節するためと、周囲の空気中に存在するゴミ粒子の汚染から蛋白質試料を保護するために、静電噴霧堆積は、図21に線図的に示すほぼ直方体のアクリル製の小さな(0

5 L) 箱で実施した。静電噴霧のたいまつ状のものと、立体顕微鏡下の基体とが、鮮明に観察できるように、この箱の一方の横にはガラス窓が付いている。チャンバー内の湿度と温度は、定常状態において、湿度では2~4%、温度では0.2℃の精度のデジタルセンサ(フィッシャー社製)で測定した。センサの応答性を良くするためと、このチャンバ内で全ての部分の湿度を同じにするために、中の空気を小さなファンで攪拌した。タンクからの乾燥空気、または水を泡立たせたながら通過させた空気を、必要な湿度に達するまでチャンバー内に導入した。その後、このファンを停止し、そして静電噴霧を開始した。噴霧実験中に、湿度が必要なレベルから3~5%逸脱した場合は、乾燥または湿ったガスを加えた。

静電噴霧で堆積された蛋白質の質量測定。自家製の水晶結晶微小天秤(QCM; ソールブレイ、1959年)を使用して、静電噴霧された蛋白質の質量を測定した。この微小天秤は、保護プレートをはずした後の市販されるATカットの水晶結晶(12-17 MHz、直径5 mmの銀の電極付き)からできている。QCMのキャリブレーションは、0.1%の砂糖水溶液で行った。容量が0.25~1.0 μ Lの間で変化するこの溶液の微小液滴を、ハミルトン10 μ Lのマイクロ注入器付きの注入器ポンプを使用して水晶電極の中ほどに落とし、そして直径1-1.5 mmのスポットとして乾燥した。周囲の空気の流れの下で溶媒が蒸発した後、この水晶を閉じたチャンバー内に導入し、そして、観察される共鳴振動数が変化しなくなるまで、乾燥窒素、または乾燥空気の流れによって更に乾燥させた。きれいな結晶における共鳴振動数と、乾燥した砂糖のスポットの結晶における共鳴振動数との違いを、砂糖の質量毎に計算した。キャリブレーション曲線は、0~2 μ gの範囲では線形であるが、実験値の逸脱は線形回帰線から2~3%あった。電極周辺部は、質量堆積に関して感応性がより小さいので、実験値のバラツキを減少させるためには、水晶電極の中心部に堆積させるべきである(ソールブレイ、1959年)。

水晶電極上への蛋白質の静電噴霧堆積は、図21に図示するように実施した。

この電極はアースされ、電極の中心部の上に位置する孔が付いた、テフロン®またはパラフィルム®からできているプラスチック遮蔽プレートを、結晶上に乗せた。

蛋白質の堆積後、この水晶結晶をQCMの乾燥チャンバー内に入れ、発振器回路に接続し、そして振動数が一定となるまで乾燥した。その後、この蛋白質堆積物の乾燥重量は、キャリブレーション曲線を使用して水晶の共鳴振動数の偏位によって決定した。透析されたAP溶液中の蛋白質の濃縮は、水晶電極上で1 μ Lの溶液を乾燥させることと、上で説明したように乾燥した残留物の質量を測定すること、によって決定した。

AP堆積物の比活性の測定。市販されているAPの乾燥粉末（シグマ・ケミカル社）を、約1 mg/mLの濃度で水に溶解させ、一晚、 10^{-6} M MgCl₂、pH 7-8の溶液に対して透析し、3000 \times gで1-2分間遠心分離し、そして、-20℃に保持した。実験前、この貯蔵溶液を解凍し、水で5倍に希釈し、そして再度遠心分離した。静電噴霧の毛管、チューブ、マイクロ注入器は、蛋白質溶液で満たした。この方法では、溶液に泡を入れることは厳禁である。

典型的には、各々の堆積において、1 μ Lの蛋白質溶液を静電噴霧した。上述したように、この堆積物の乾燥質量を測定後、蛋白質のスポットを、緩衝溶液（0.2 M TRIS/HCL緩衝溶液、pH 9.5、1 mM MgCl₂、0.1% Tween 20）の1-2 μ Lの液滴で3-4回抽出した。その後、これらの抽出物を混

合し、同じ緩衝溶液で40 μ Lの体積となるように希釈した。蛋白質溶液の静電噴霧において、炭化水素が存在する場合、溶液中の蛋白質重量は、蛋白質-炭化水素の比率は静電噴霧によっても変化しないと仮定して計算した。

APの活性は、5-20 μ Lの抽出溶液をシグマ・ファースト社の錠剤で作成されるTRIS/HCL緩衝溶液のp-NPP溶液1.0 mLに加えた後、すぐに測定した。活性はサーモスタット付きの部屋で、温度 25 ± 1 ℃で測定した。コンピュータ制御された分光光度計（AVID社、型式118DS）で410 nmで記録、2-5分間で吸収度を測定して、線形回帰分析によって決定される活性は、酵素濃度に直線的に依存することがわかった。この比活性は、上の質量測定

部で説明したように重量分析で測定される蛋白質濃度を使用して計算した。

一連の各堆積実験では、静電噴霧堆積のために準備された溶液および乾燥した試料におけるAPの比活性を測定した。後者の場合では、1 μ LのAP溶液を、水晶電極上に直接被着し、空気の流れによって乾燥した。これの乾燥したものの質量を測定後、この堆積物が抽出され、そして、その活性は静電噴霧で堆積した試料について説明したところと同じように測定した。

炭化水素の効果。乾燥後、ショ糖とトレハロースとのAP活性の回復の効果を調べるために、希釈したAP溶液の微小液滴(5 μ L)を、ガラス表面上に落とし、そして、同量の水または異なる量の炭化水素を含む水溶液を、各液滴に加えた。十分に混合した液滴を、ウォーターポンプによって作られる減圧下の乾燥器内で乾燥した。その後、乾燥したスポットを、静電噴霧堆積のスポットで説明したように溶解させ、そして、それらの活性を測定した。

結果及び検討

静電噴霧で堆積させた試料の質量の測定。堆積した質量は、水晶振動の共鳴振動数のシフトによって決定した。しかしながら、堆積物の質量だけではなく、その他の要素、特に堆積物の粘弾性的な特性が振動数の変化に影響を及ぼすものである。種々の湿度条件下で得られる静電噴霧堆積の蛋白質試料は、顕著に異なる内部構造と充填密度を有する。湿度Aが50%以下で作成されると、これらは不透明または乳白色となり、湿度Aが70%以上で静電噴霧堆積されると、透明または完全に見えない状態となる(乾燥で得られるものと似ている)。このような

構造的な変化が堆積物の質量のQCM測定に及ぼす可能性を特別な実験で検査した。低湿度で得られる、乾燥した静電噴霧堆積物の水晶の共鳴振動数の測定後、この堆積物の水晶を、Aが100%でペトリ皿に30-60秒間入れ、再び乾燥し、そして、その後、共鳴振動数を再度測定した。乳白色の堆積物は、この処理の結果、透明なフィルムへと状態が変化した。この変化によっては共鳴振動数は変化しなかった。異なる湿度の状態下での静電噴霧堆積物では、観察し得る構造の変化は、質量測定には影響しないものと考えられる。

静電噴霧堆積の効率。この静電噴霧の効率は、静電噴霧で堆積された試料の乾

乾燥質量と、同じ蛋白質溶液の同量の体積を乾燥させた蛋白質の試料の乾燥質量との比率で定められる。この値は、

(1) 試料が堆積する時に通過する孔の直径 : d

(2) 毛管先端から水晶電極までの距離 : h

(3) 静電噴霧堆積で使用する電圧 : V

(4) 静電噴霧の毛管のデザイン

に対して顕著な依存性を示す。典型的な幾何学的なパラメータ、 $h = 10 \sim 15$ mm、 $d = 2$ mm、低電圧 $V = + (3 \sim 4)$ kV では、この静電噴霧堆積の効率は、表 2 の結果に示すように毛管のデザインに依存して 60 % から 80 % の間で変化した。ブリッジ型の毛管の効率がやや低いのは、液体ブリッジに入る蛋白質溶液の漏れによって、AP が $pH = 4.4$ (イングストロム、1961 年) を持つためと説明することができる。AP 分子は、 pH が 4.4 よりも大きくなると負に帯電され、これらの実験では正に帯電された電極に向かって移動すべきものである。

表 2

静電噴霧堆積の効率、及び同じ条件¹で異なる毛管を使用して静電噴霧した場合の AP の比活性における回復の百分率

	内部電極	外部電極	ブリッジ型
活性 ² %	55 ± 10	32 ± 9	31 ± 12
効率 ³ %	79 ± 7	78 ± 8	62 ± 9

1 毛管の電圧 $V = + (3 \sim 4)$ kV、電流 $I = 1 \sim 50$ nA、

流量 $0.1 \mu\text{L} / \text{分}$ 、先端から水晶表面までの距離 10 mm、

静電噴霧チャンバーの湿度 $A = 65 \pm 5$ %。

2 初期の溶液の AP の比活性と静電噴霧堆積した AP の比活性との比率。

3 静電噴霧堆積した試料の質量と、静電噴霧される溶液中の蛋白質の質量との比率。

内部電極付きの毛管からの静電噴霧の堆積は、湿度によって効率は何ら依存性を示さない。湿度を10%から90%まで変化させた状況で、 $V = 3 \sim 4 \text{ kV}$ の場合、48回以上の独立した測定の平均は、静電噴霧堆積の効率は $74 \pm 6\%$ であった。電圧を $6 \sim 7 \text{ kV}$ に増加させると、結果として静電噴霧堆積の効率は100%になった。

静電噴霧で堆積したAPの比活性。静電噴霧の堆積物を溶解させた後のAPの比活性と、初期の溶液におけるAPの比活性とのパーセントの比率を、静電噴霧堆積における蛋白質の元の性質の保持の目安として使用する。図18A、18Bで説明するデータで示されるように、静電噴霧堆積が、高電圧($7 \sim 8 \text{ kV}$ 以上)、大電流($500 \sim 1500 \text{ nA}$ 以上)の条件下で実施される場合は、APは大きな損傷を被り、そしてその活性のほとんど全てを失う。以下の要因が、これらの条件下でAP不活性化をもたらすものと考えられる。

(i) 電極上で起こる電気化学的反応による静電噴霧毛管の内部の不活性化

(ii) ガス相でのコロナ放電生成物の反応の結果による不活性化

(iii) 目標の電極との衝突の結果による不活性化

(iv) 乾燥の結果による不活性化

最後の要因(iv)は直接的に乾燥させた場合と同じ効果を有し、毛管のデザインと電流とは無関係であると予想される。図18A、22、23に示すように、真空下のガラス上で直接的に乾燥させた場合、QCMの銀の電極上において空気の流れて乾燥させた場合、及び湿度 $A = 65\%$ 、電流 50 nA 以下で内部電極付きの毛管からの静電噴霧堆積の場合、APは不活性化(約45%まで)される。同様の電流、湿度の状況下、他の2つの毛管のデザインで静電噴霧堆積した場合、APはより顕著に不活性化(70%まで)される(表2を参照されたい)。

液体ブリッジ付きの毛管を越える内部電極付きの毛管の優位性は、電気化学的反応が静電噴霧堆積における主たる損傷の要因であると仮定するならば、予想できず、説明できないことである。図18A、18Bの下方の曲線が示すように、この内部電極付きの毛管が、全ての電圧、電流の状況下において外部電極付きの毛管より顕著に損傷が少ないことを、毛管内の電気化学的反応によって説明する

ことも難しい。低い電流で外部・内部電極付きの毛管から堆積したAPの活性を、同じ毛管から電流 1500 nA の静電噴霧堆積の前後で、測定し、比較した。電極によって直接酸化された、または毛管内の水の酸化による低い pH によって損傷されたAPの毛管内に集められた静電化学的生成物は、連続する静電噴霧堆積の活性を減少させる結果になることは予想されることである。牛の腸のAPは、 pH $4.5 - 5.0$ 以下に曝すことによって不可逆的に不活性化され(マクコーム他、1979年)、ヴァン・バーケル他(1979年)の概算では、 pH は電流 $I = 250\text{ nA}$ 、流量 $1\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ の状況下、 $\text{pH} = 3 \sim 4$ まで下降させることができる。しかしながら、静電噴霧の毛管に双方の型においては、前者と後者の間の堆積物のAPの比活性には、顕著な違いは見られない。従って、高電圧、大電流下のAPの不活性化は、コロナ放電の生成物との反応の結果として、または目標の電極との衝突の結果として、毛管の外部で起きているものと考えられる。衝突エネルギーは、電位の上昇を招き、衝突により蛋白質の分裂を引き起こす。このことにより、電圧と電流の増加でAPの不活性化が増加されることを説明できる。 I が $200 \sim 300\text{ nA}$ 以上での静電噴霧堆積のコロナによる生産物の生

成は、静電噴霧チャンバー内のオゾンの匂いの特性によって判明する。ポンプが停止した後においてさえ大電流を維持することと、目に見える静電噴霧のたいまつ状のものの消滅は、これらの状況下においてコロナ放電の存在を示すものでもある。大電流での静電噴霧は、結果として毛管先端から銀メッキを剥離させることも判明した。外部電極付きの毛管は、内部電極付きの毛管よりも容易にコロナ放電を維持させ、これによって、外部電極付きの毛管から静電噴霧堆積した場合に、何故低い電流によってより高い程度までAPが不活性化されるかが説明できる。 10^{-4} M の AgNO_3 をAP溶液に加えることは何ら阻害とならないことから、APの堆積物の Ag イオンによる汚染は、外部電極付きの毛管からのAPの堆積物の不活性化をもたらさないようであることは、注目に値する。

これらの実験は、高電圧、大電流下における静電噴霧堆積の不活性化のメカニズムに関係なく、静電噴霧の堆積が、内部電極付きの毛管から電圧 $+4.5\text{ kV}$ を越えず、電流 50 nA 未満で実施されるという条件では、APが直接乾燥中と比

べてその活性をより多く保存させることを立証するものである。これらの条件では、前に挙げた損傷要因は、全く発生せず、乾燥プロセスのみが、ただ1つだけ残された不活性化の要因であると考えられる。

冷凍乾燥で処理される場合、多くの蛋白質がその活性を失うことは、よく文書で記述されており、その中の幾つかは、冷凍乾燥、または室温の乾燥によって完全に不活性化される(クロウ他、1987年、ギブソン他、1992年)。二糖は乾燥において蛋白質を保護する機能があることも、よく知られている(ギブソン他、1992年)。この図22に示したデータは、APが、ショ糖とトレハロースの両者によって、乾燥による不活性化から同じく保護されることを示す。この二糖を50% (w/w) 加えると、APの活性を100%保存するのに十分である。図18Aの上側の曲線は、同じ物質であるショ糖が、乾燥においてAPの活性を保護し、静電噴霧の堆積においても同じように良く保護することを示すものである。静電噴霧堆積が小さい電流で内部電極付きの毛管から実施されるという条件で、ショ糖の濃度(50% w/w)を同じにすると、乾燥したAPの活性の100%を保護し、このショ糖の存在は、静電噴霧で堆積された酵素のAPの活性の回復を100%に上昇させる。これらの結果は、これらの静電噴霧の条件下では、

乾燥が主たる損傷の要因であるということを指し示す。図23の結果は、低い湿度の状況において、静電噴霧で生成された液滴のガス相での急速乾燥は、表面上の溶液の低速乾燥(図22で45%減少を示す)よりも、APの活性に与える損傷が少ない(30%減少)。しかしながら、この酵素は、60%を越える湿度で静電噴霧堆積が実施される場合、より多大な損傷を被る。おそらく、微小液滴の降下に伴う、湿る/乾燥の複数回のサイクルが原因と推定され、この液滴は、この条件では基体への行程では完全に乾燥されることはない。即ち、静電噴霧の堆積が、保護物質の存在下、穏かな条件で実施される場合、APの機能的な活性は、金属電極への静電噴霧の堆積において完全に保存できる。

本発明について十分に説明してきか、当業者は、不適切な実験でないこと、本発明の範囲、趣旨を外れない条件で、広い範囲において等価なパラメータ、濃度

および条件で本発明を実施し得るものと理解されたい。

本発明について具体的な好適実施例に関して説明してきたが、本発明は、多くの変形が可能であると理解されたい。この出願は、本発明の原理に一般的に従うどのような変更、用途或いは適用も含むものであり、本明細書の記載から離れるものであるが、本発明の属する技術分野において既知であるか慣用されたものであり、請求の範囲に記載された、本明細書で先に説明した要旨に適合するものを含むものである。

本明細書で述べてあるすべての参考文献は、定期刊行物または要約書、公表された、またはこれに相当する米国、外国の特許出願、特許査定された米国、外国の特許出願、その他の参考文献を含むものである。これらは、全てのデータ、表、図、引用した参照で示される文を含み、本明細書で参照した箇所は全て包含される。更に、これらの参考文献において引用されている参考文献の全ての内容物も、参考文献としてすべて含まれるものである。

既知の方法のステップ、従来方法のステップ、既知の方法、或いは従来方法についての参照は、本発明の要旨、説明或いは実施例が、当該技術分野において開示され、教示され、暗示されるものであることを認めるものではない。

具体的な好適実施例についての前述の説明は、他人が実施できるように、従来技術（本明細書が引用する参照の内容を含む）を適用することによって、本発明

の一般的な性質を十分に明らかにしており、適切でない実施ではなく、本発明の一般的な概念を離れることなく、特定の好適実施例のように様々な応用に、容易に変更、及びまたは適合する。従って、このような適合、変更は、開示された好適実施例に均等な範囲、方法の範囲であることを意図しており、本明細書で説明した示唆、教示に基づくものである。本明細書の語句、専門用語は説明の目的のためであり、これによって限定されるものではない。本明細書中のこのような語句、専門用語は、本明細書の示唆、教示を考慮して、当該技術の一般的な技術を有する者の知識を組み合わせ、当業者によって解釈されるものである。

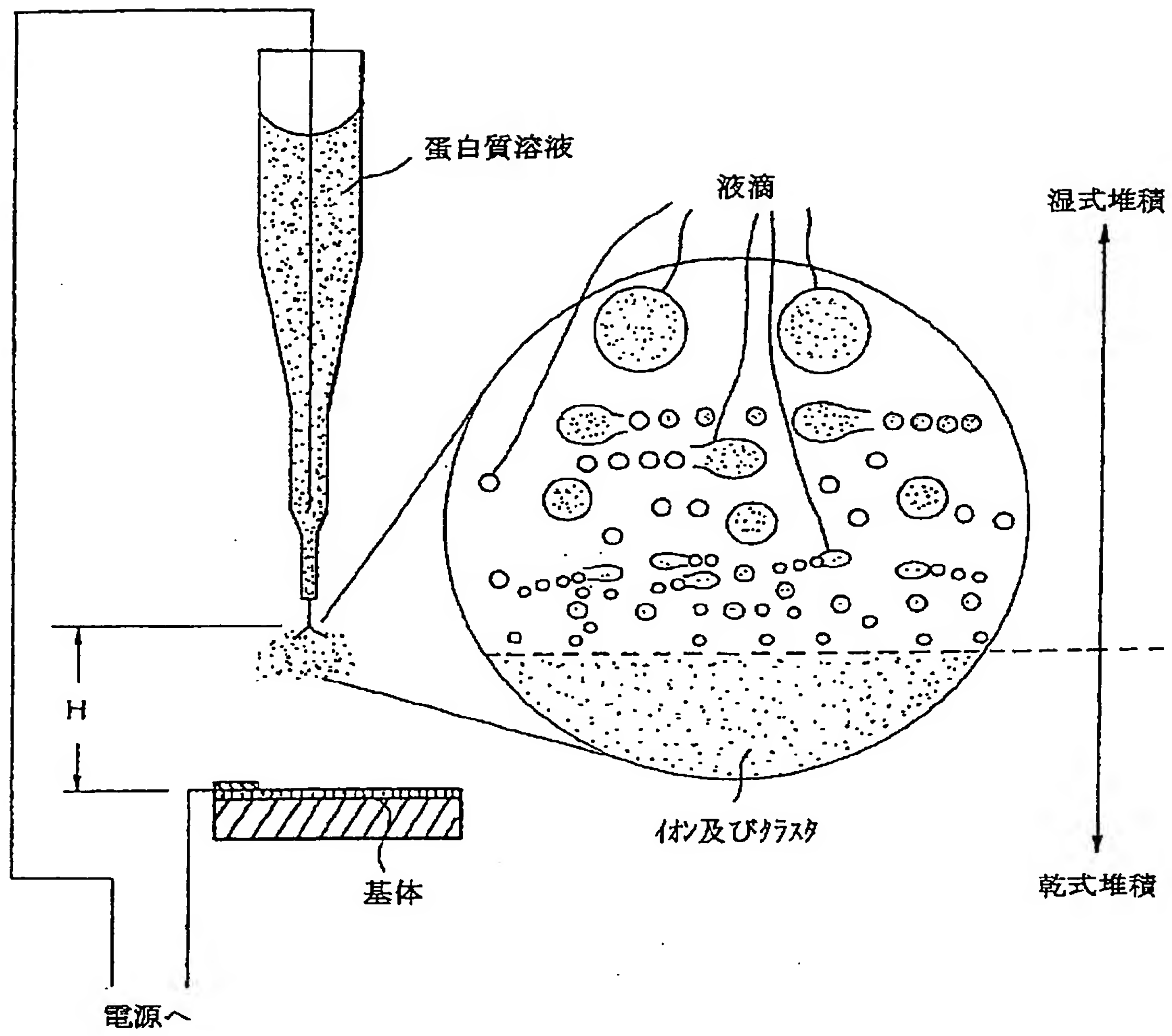
参照文献

- ベルトリニ他、Nucl. Instr. Meth.、32:355-356、1965年
バーシャ (Bhatia) 他、Anal. Biochem.、208:197-205、1993年
ブルムバーグ他、LA-2711、1962年
ブルニンクス他、Nucl. Instr. Meth.、13:131-140、1961年
ブッコ (Buchko) 他、マテリアルズ・リサーチ・ソサイアティ・シンポジウム・
プロシーディングスにて、コテル他 (Eds.)、ピッツバーグ、ペンシルバニア州、
414:23-28、1996年
チェン他、Nucl. Acids Res.、24:2183-2189、1996年
クロウ他、Biochem. J.、242:1-10、1987年
イングストロム、エル、Biochem. Biophys. Acta、52:36-41、1961年
フォダー (Fodor) 他、サイエンス、251:767-773、1991年
ギブソン他、バイオセンサーズ・アンド・ケミカル・センサーズ; ACS Symp. Ser.、
エデルマン他、(Eds)、ACS、ワシントン・ディー・シー、487:40-55、1992
年
ハメス他、核酸ハイブリダイゼーション、IRL Press、ワシントン・ディー・
シー、1987年、ページ87-90
ハート他、エレクトロアナリシス、6:617-624、1994年
ハーマンソン他、インモバライズド・アフィニティ・リガンド・テクニックス、
アカデミックプレス、ニューヨーク、1991年
ジョンソン他、ダイアグノスティック・バイオセンサ・ポリマーズにて、
eds.A.M. Usmani and N.Akmal、アメリカン・ケミカル・ソサイアティ
ワシントン・ディー・シー、1994年、ページ84-95
マクコーム他、アルカリン・ホスファターゼ、ブレナム・プレス、
ニューヨーク、1979年
マイケルソン、ディー、エレクトロスタティック・アトマイゼーション、
IOP パブリッシング、ニューヨーク、1990年
モロゾフ他、Int. Scanning Microscopy、7:757-779、1993年
ナカモト他、Sens. Actuators、13:165、1988年

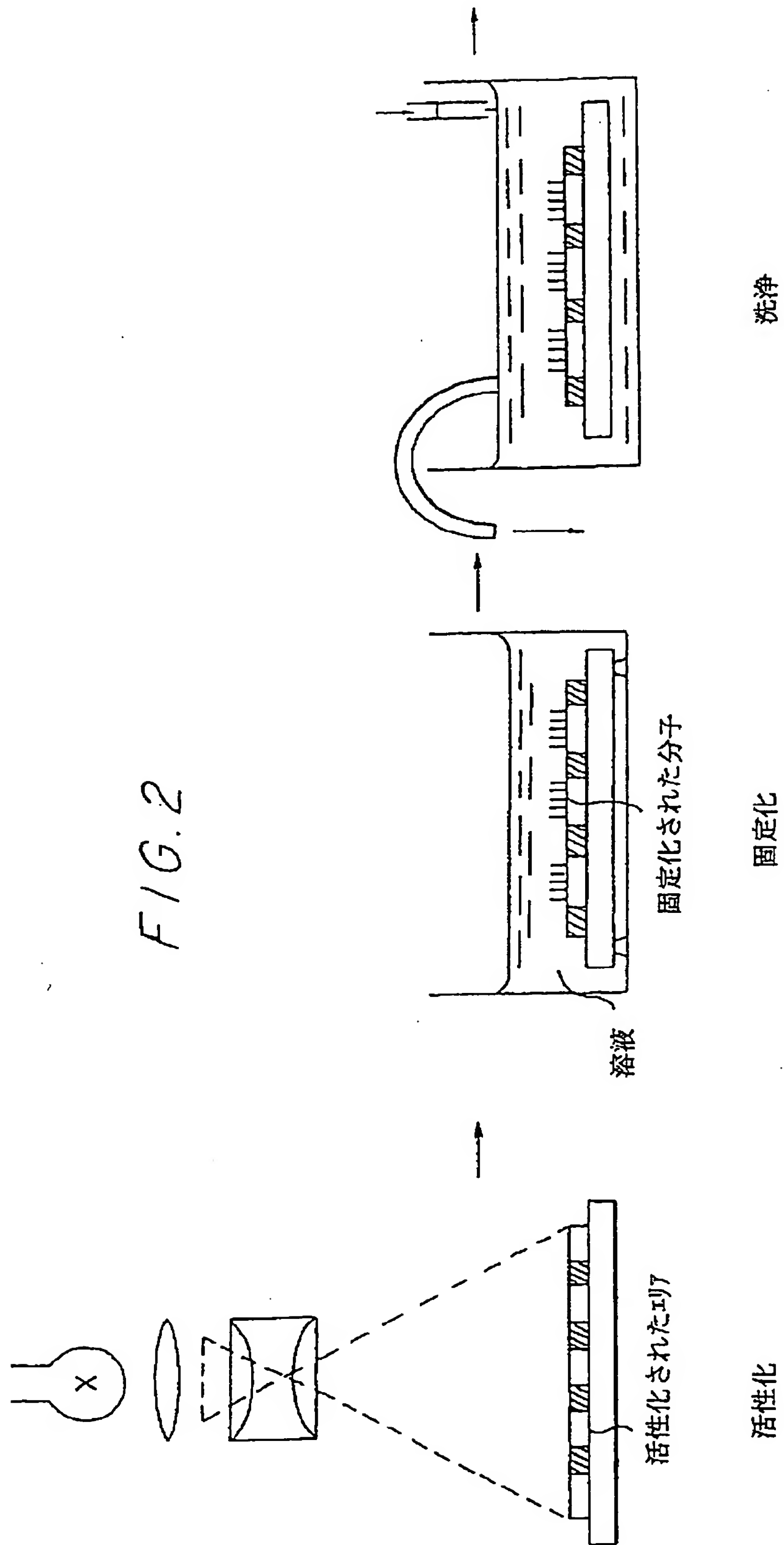
- ニューマン他、Anal. Chem. Acta, 262:13-17、1992年
- ピース他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:5022-5026、1994年
- プリチャード (Pritchard) 他、Anal. Chem., 67:3605-3607、1995年
- レイマン他、Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res., B88:29-34、1994年
- レイザー他、Trans. Faraday Soc., 65:2168-2185、1969年
- ロビンソン, ピー・エス、Nucl. Instr. Meth., 40:136-140、1995年
- ソールブレイ, ジー (Sauerbrey, G.), Zeitschr. fur Phys., 155:206-222、
1959年
- シャロン他、ゲノム・リサーチ, 6:639-645、1996年
- ストライク他、ダイアグノースティック・バイオセンサ・ポリマーズにて、
eds.A.M. Usmani and Akmal、アメリカン・ケミカル・ソサイアティ
ワシントン・ディー・シー、1994年、ページ299-306
- スリヴァン他、J. Am. Soc. Mass. Spectrom., 7:329-341、1996年
- サンダット (Thundat) 他、ウルトラ・マイクロスコピー, 42-44:1083-1087、
1992年
- ヴァン・バーケル (van Berkel) 他、Int. J. Mass. Spectrom and Ion Processes,
192:55-67、1997年
- ヴァン・デア・エイク (van der Eijk) 他、Nucl. Instr. Meth., 112:343-351、
1973年
- ウィルム他、Int. J. Mass. Spectrom. Ion Processes, 136:167-180、1994年
- ウィルム他、Anal. Chem., 68:1-8、1996年

【 図 1 】

FIG. 1



【 図 2 】



【 図 3 】

FIG. 3A

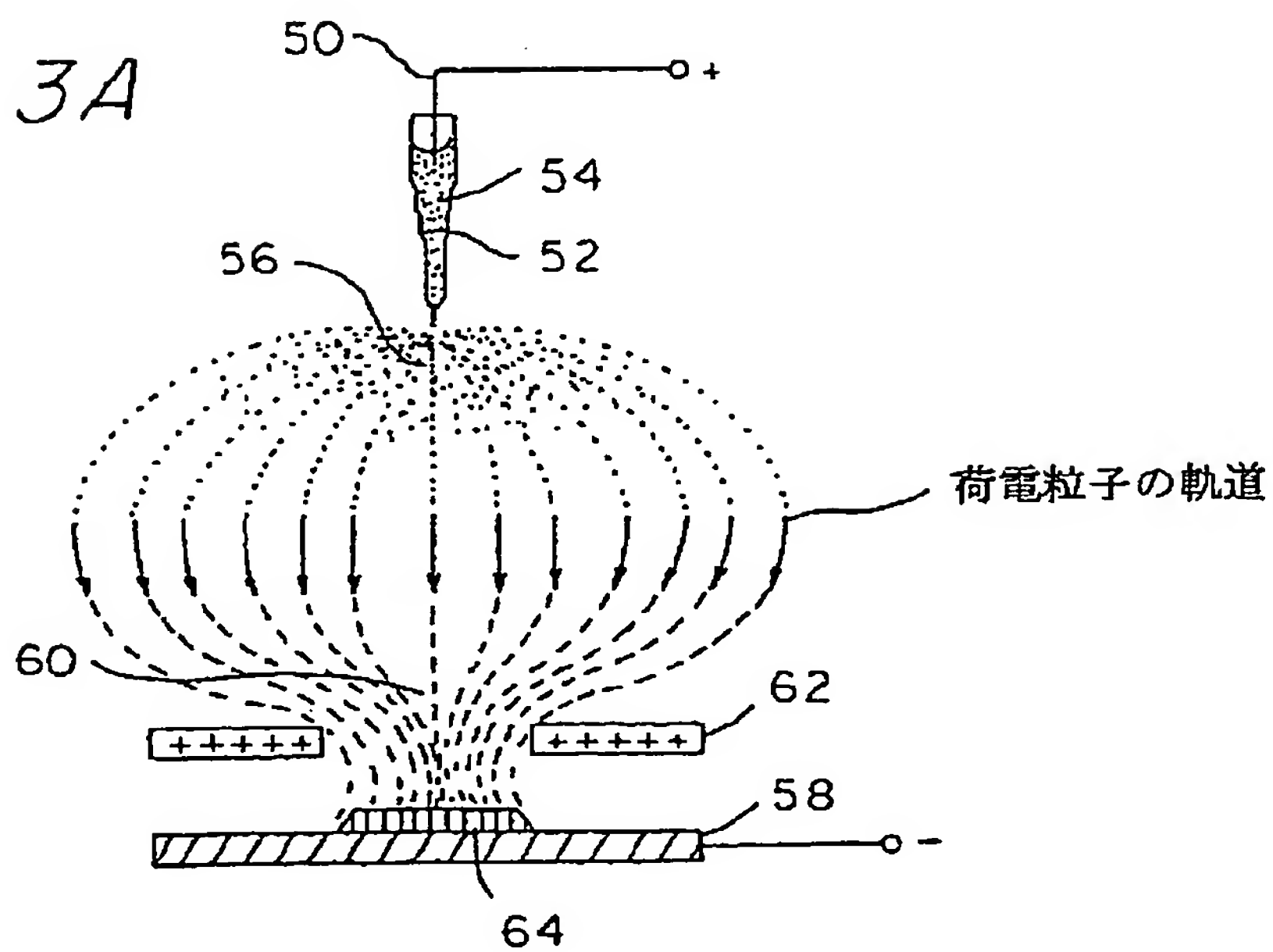
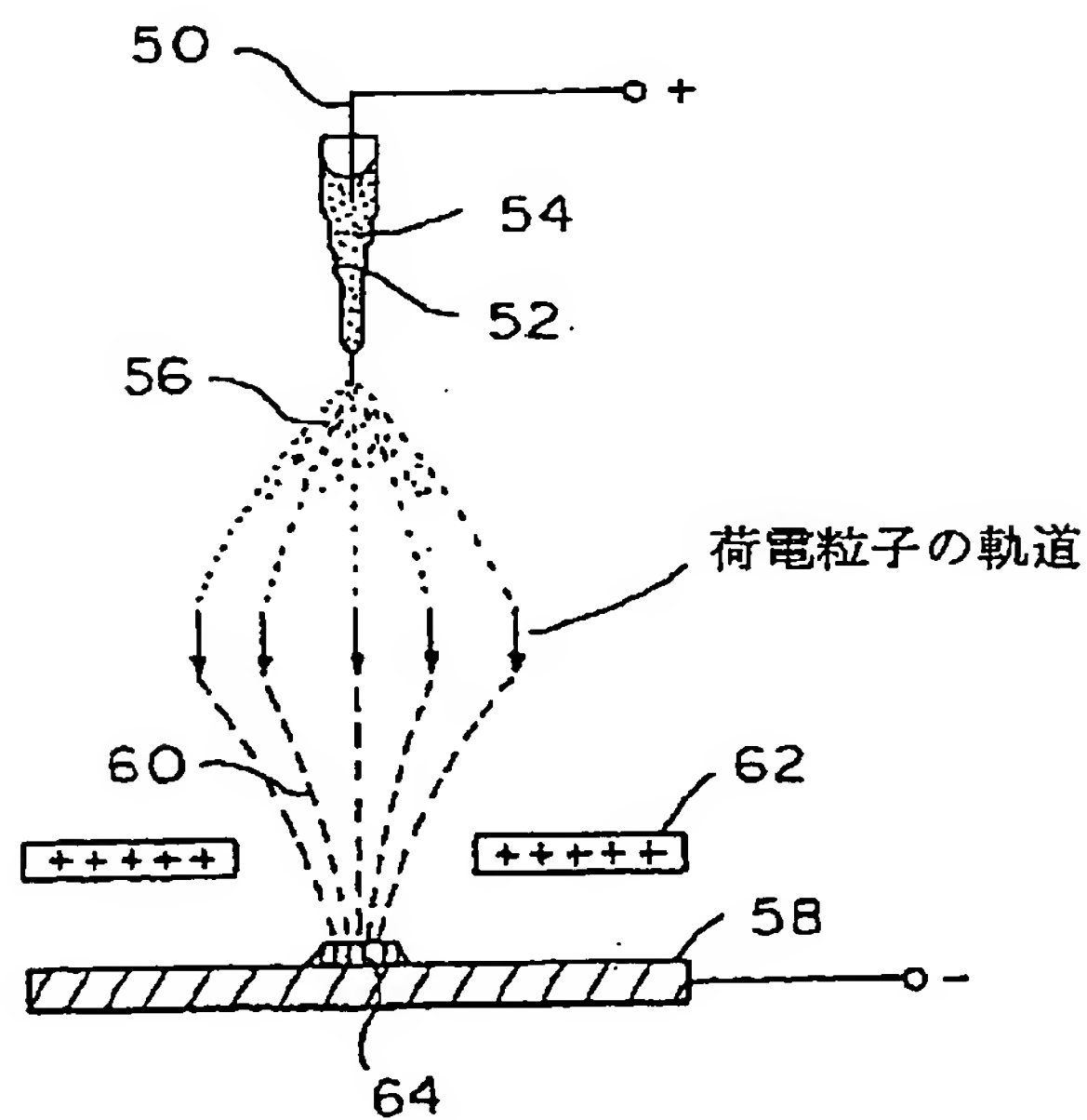
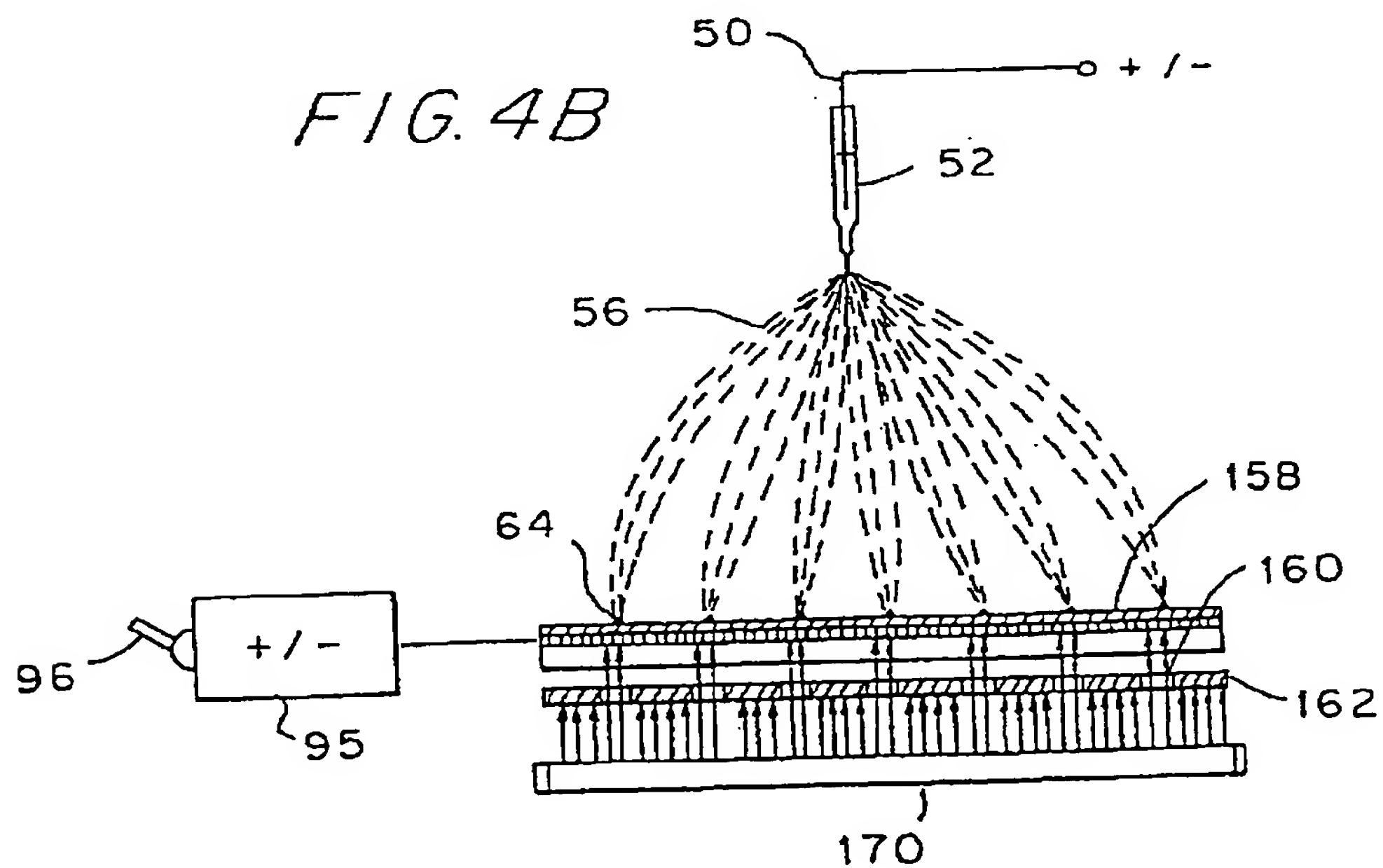
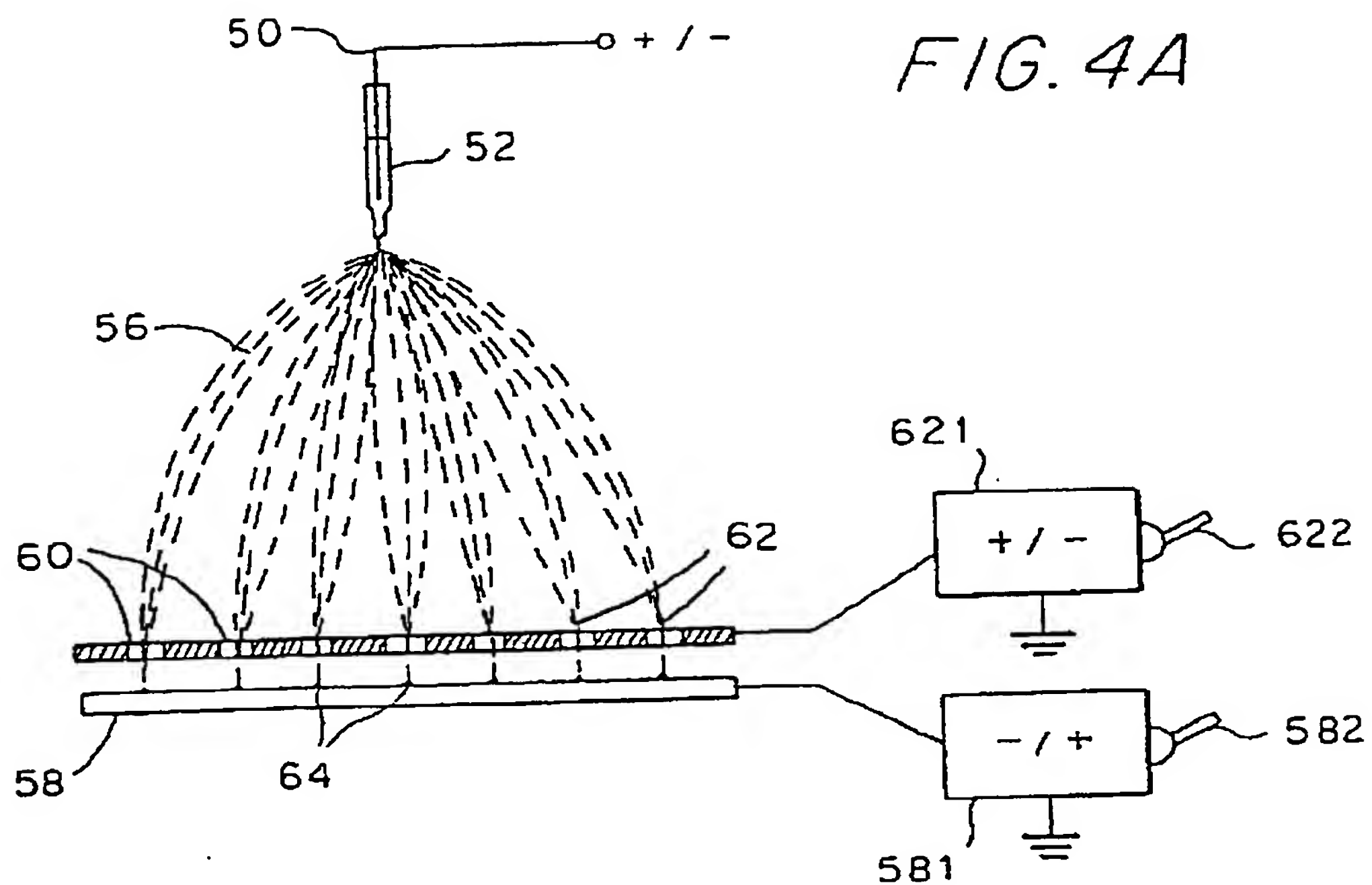
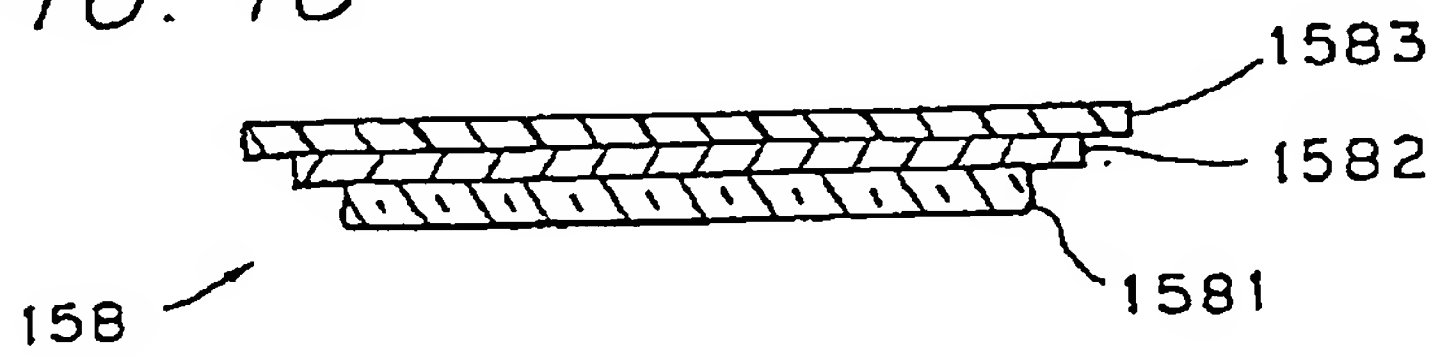


FIG. 3B



【 図 4 】

*FIG. 4C*

【 図 5 】

FIG. 5A

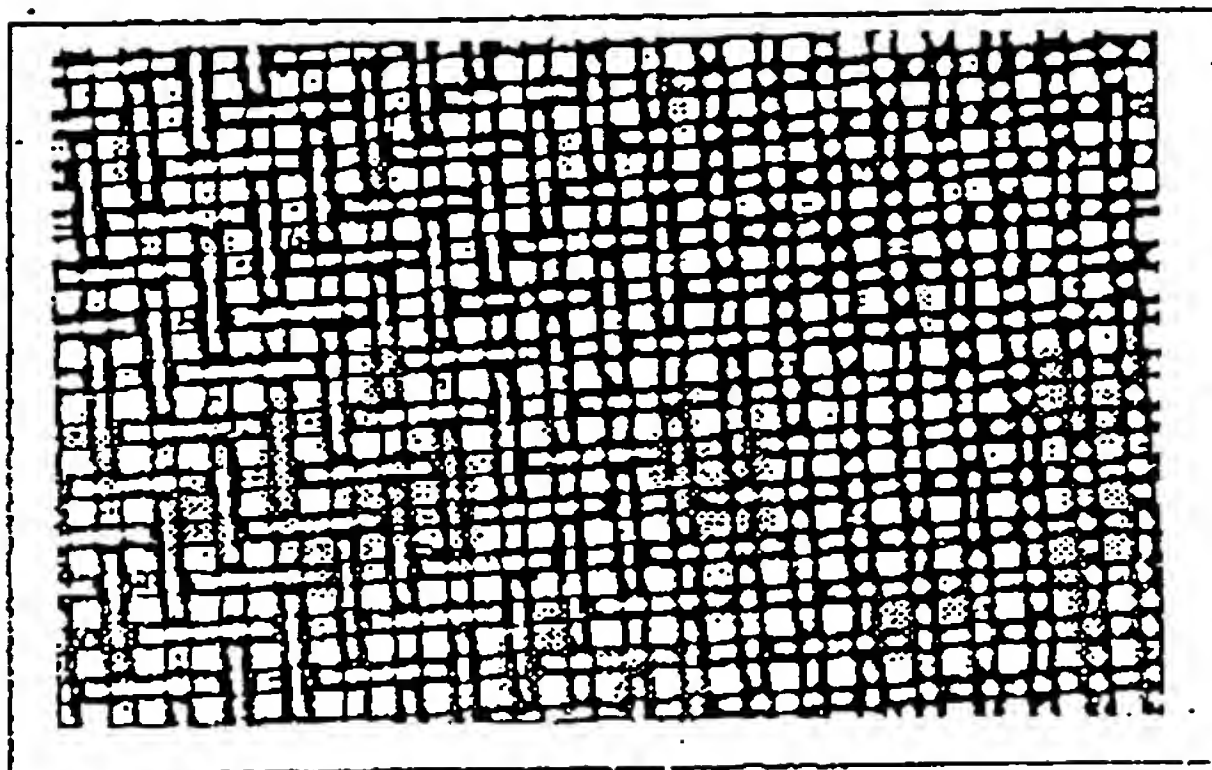


FIG. 5B

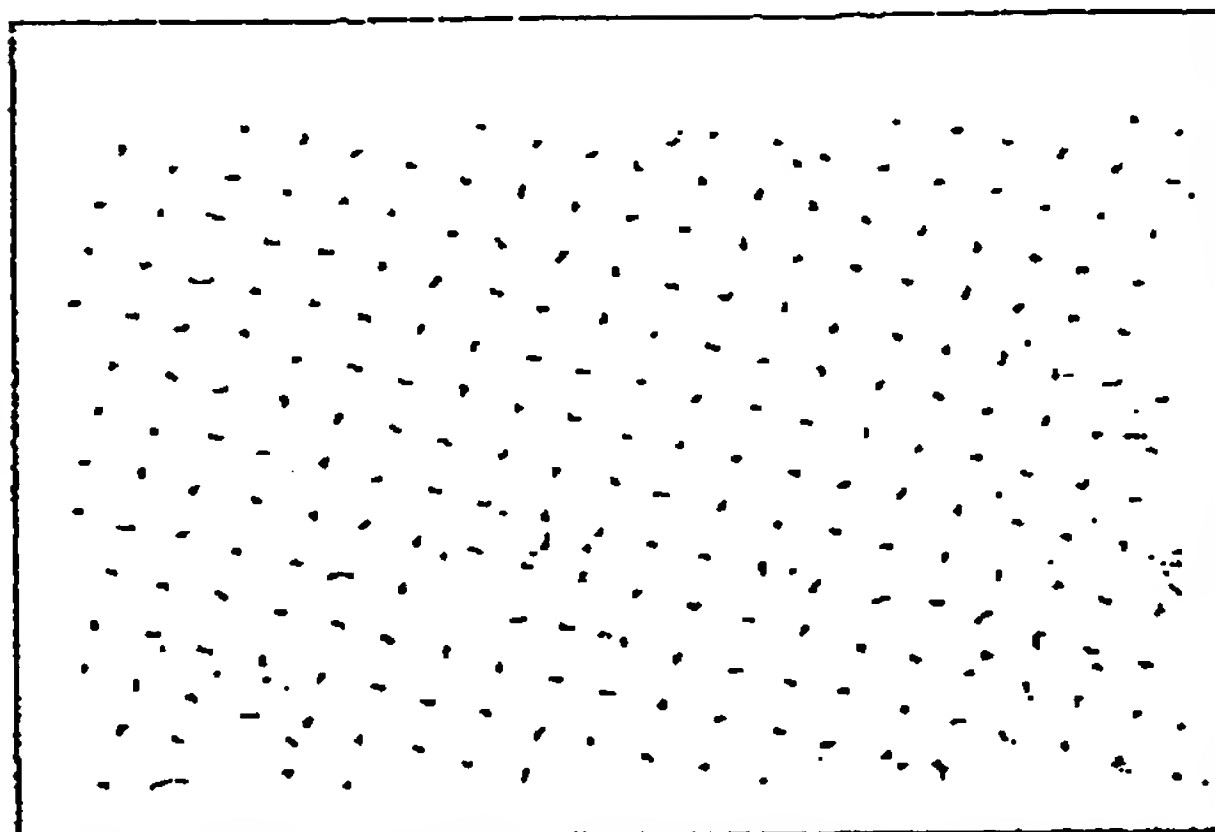
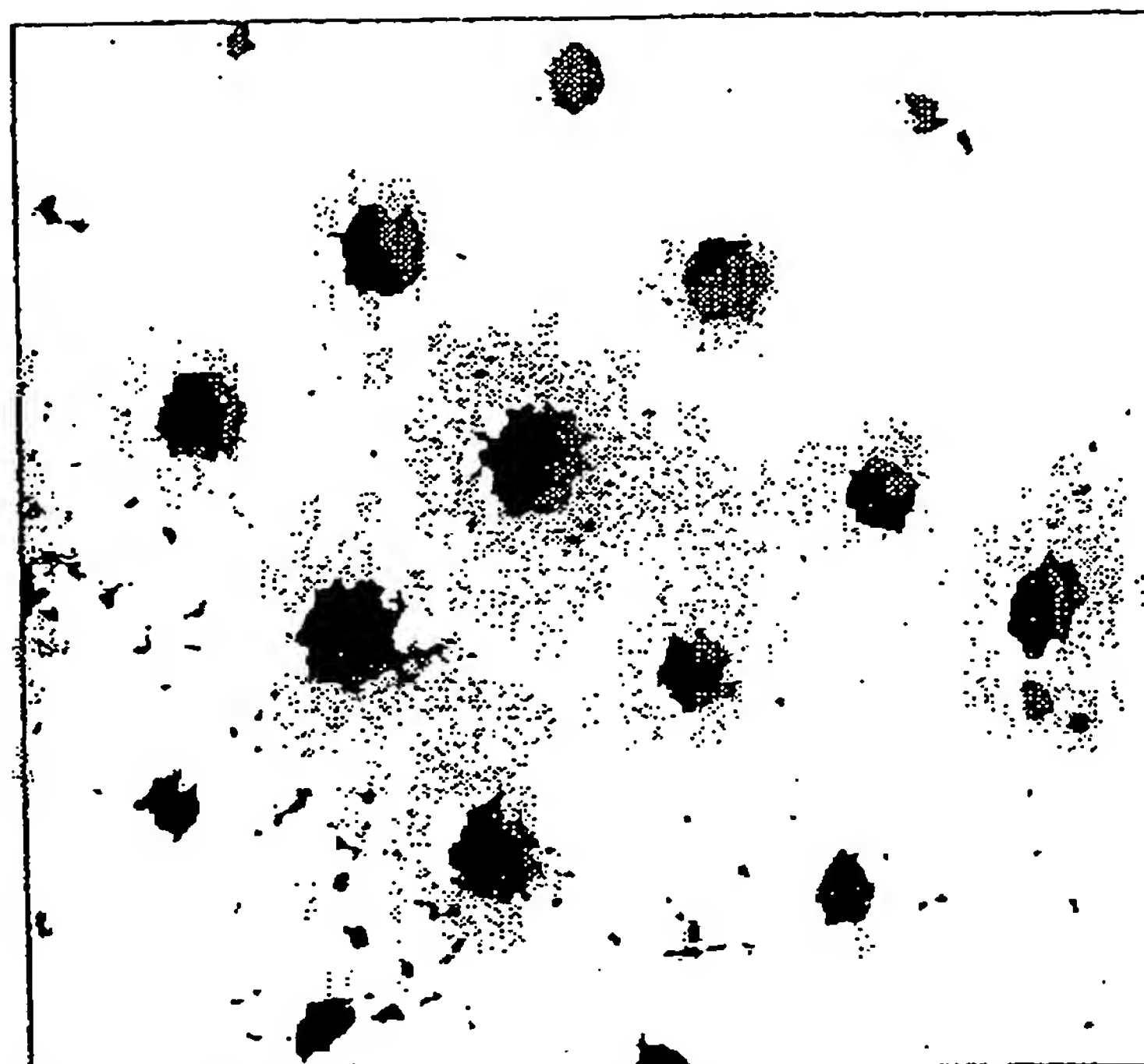


FIG. 5C



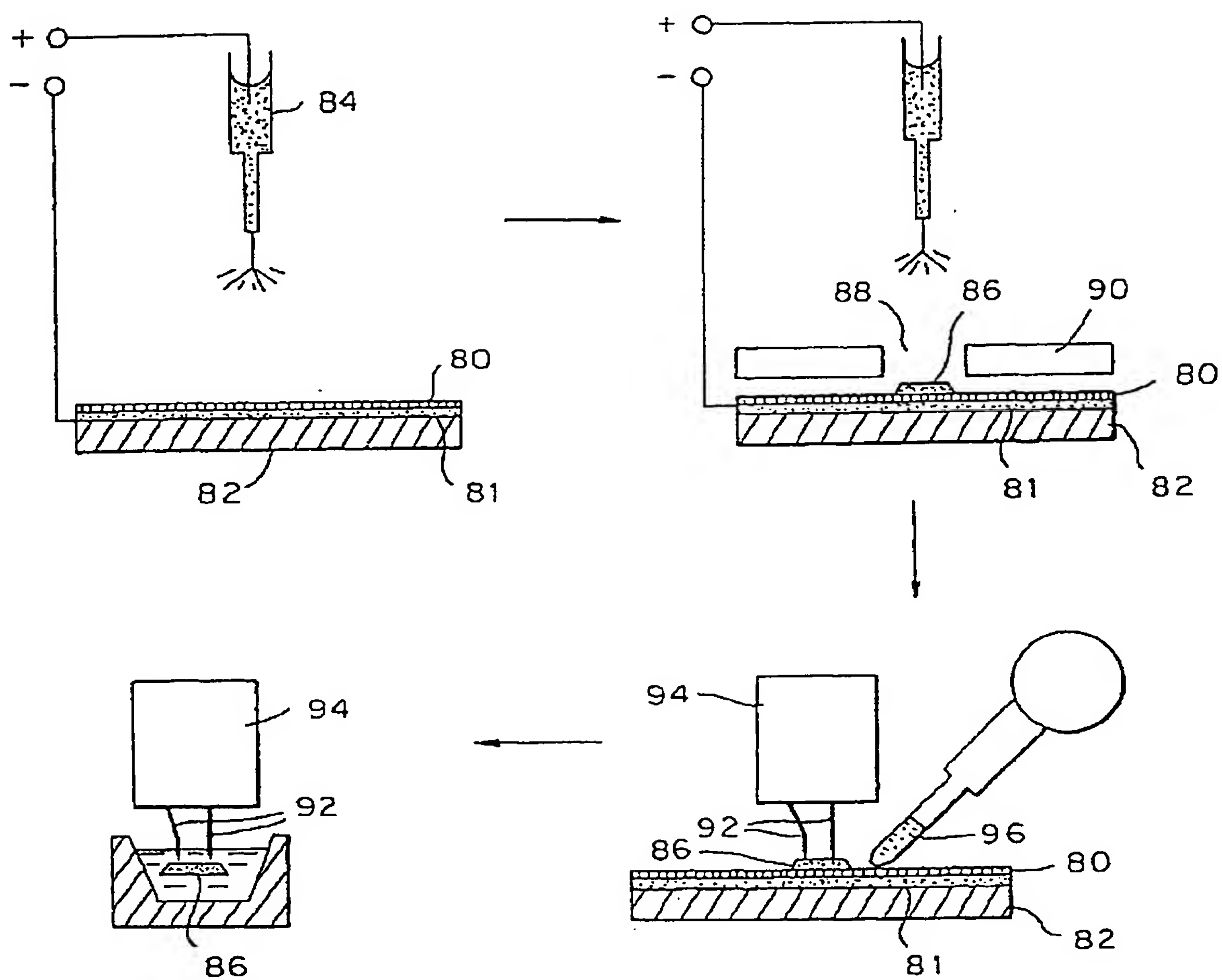
【 図 5 】

FIG. 5D

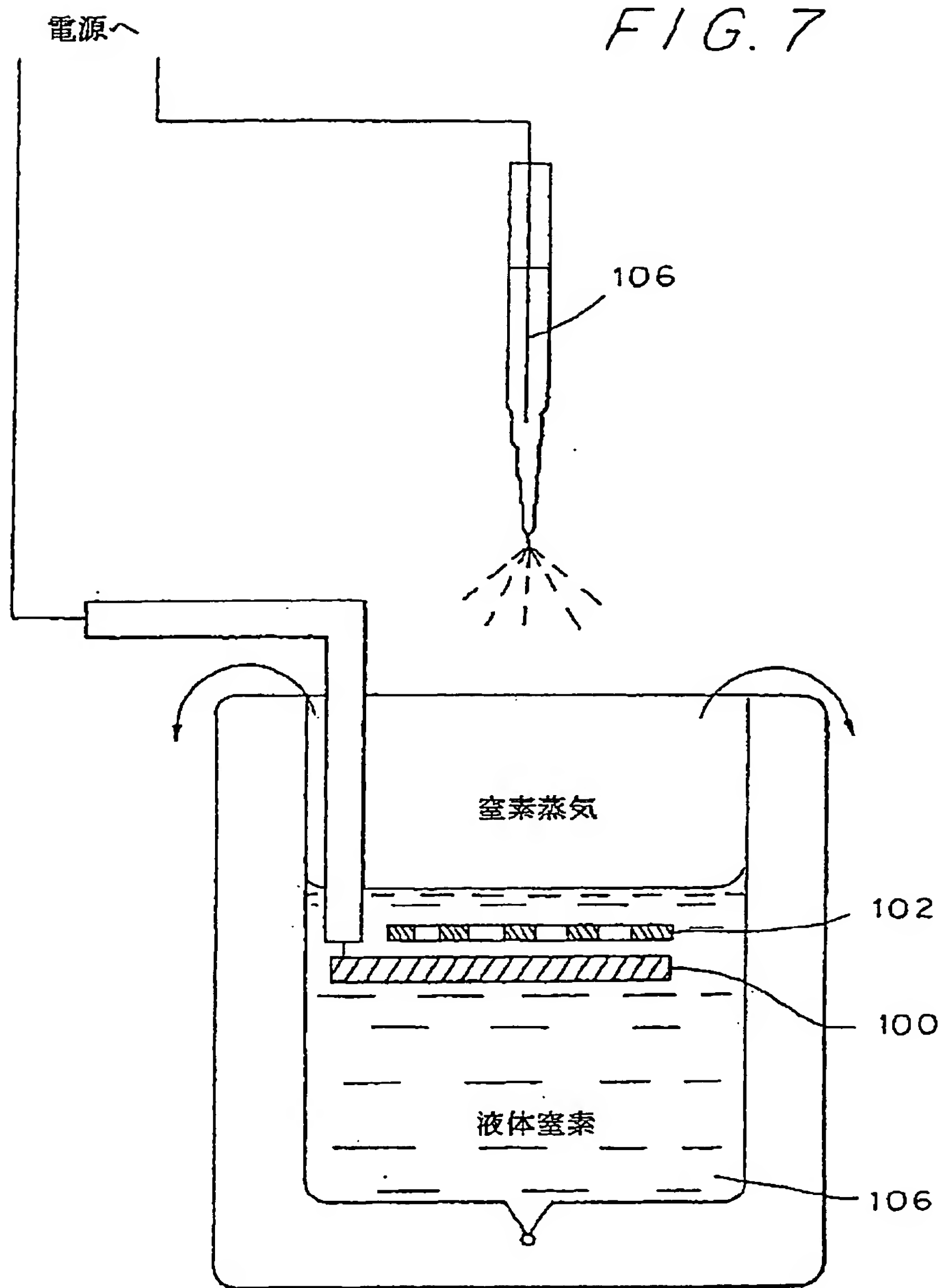


【 図 6 】

FIG. 6

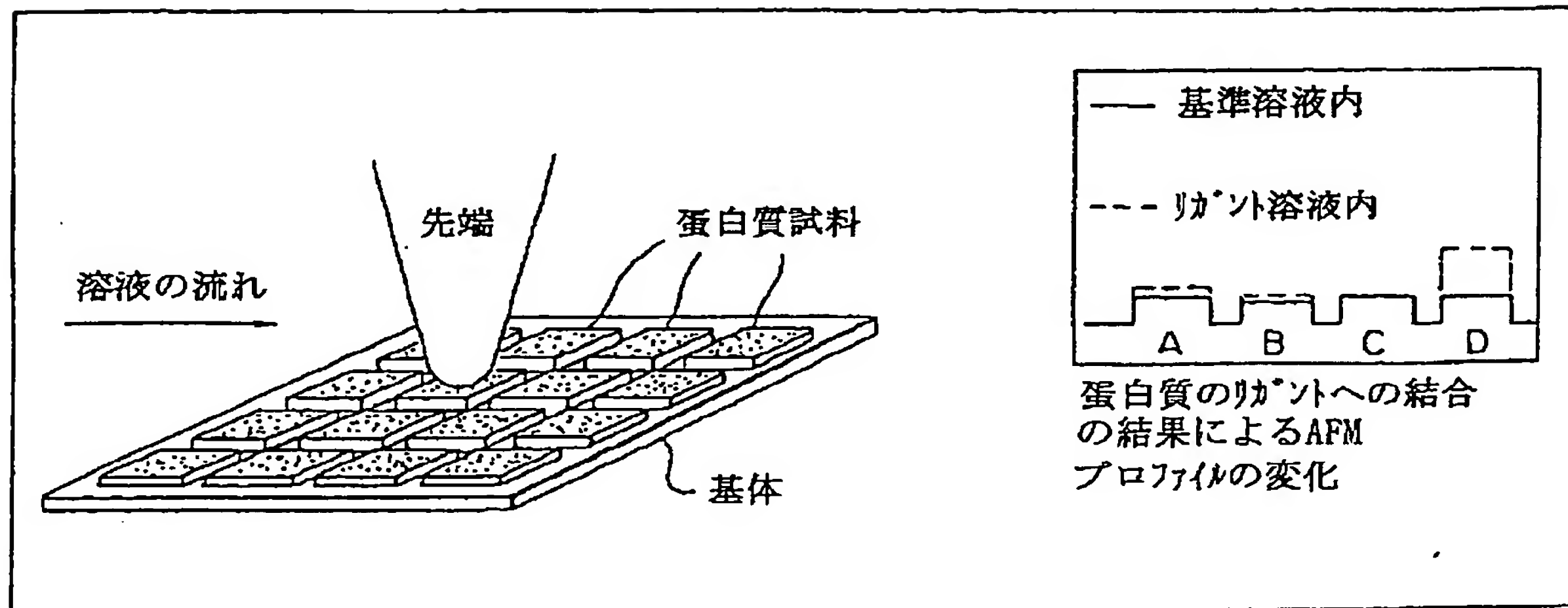


【 図 7 】



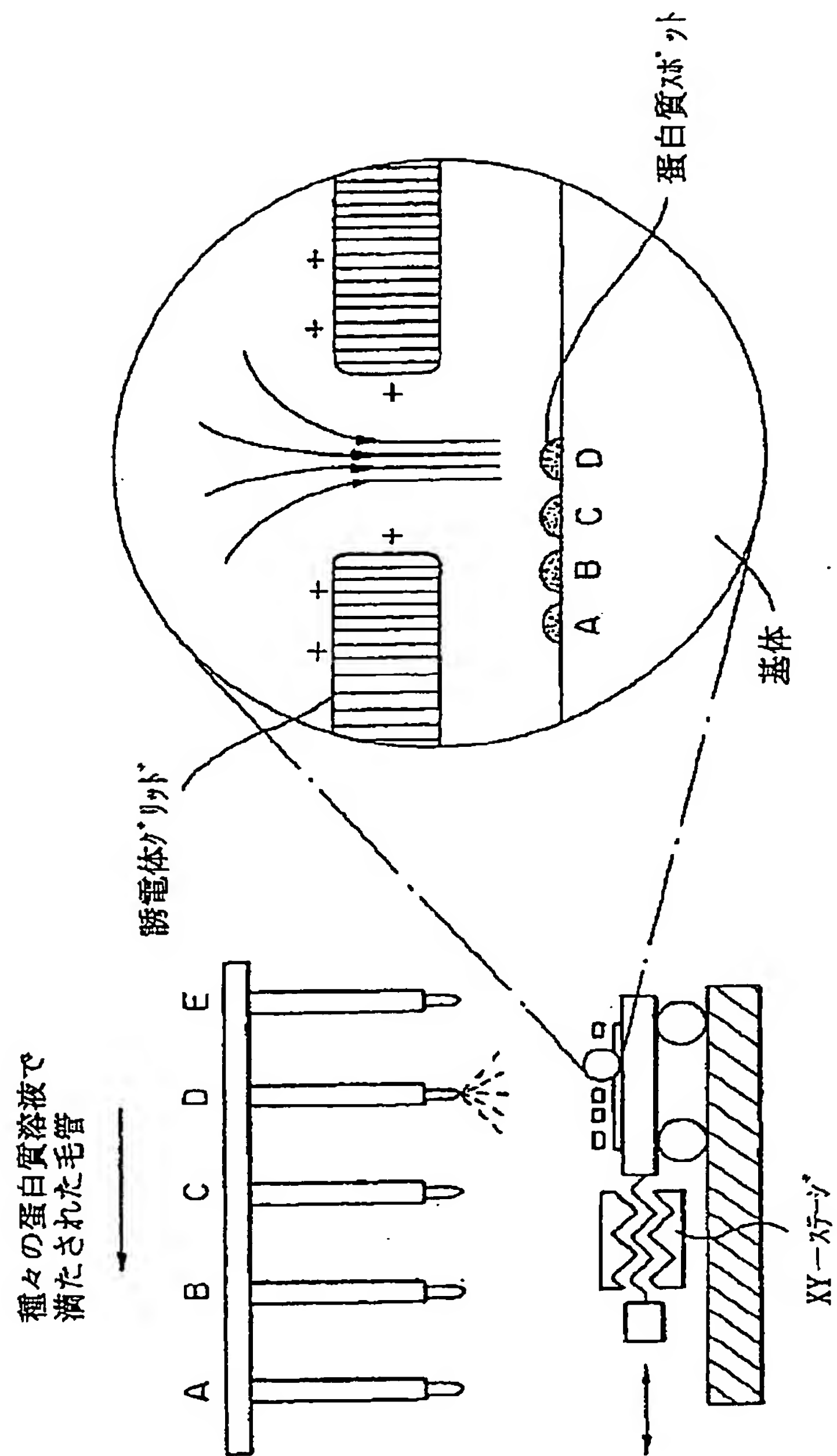
【 図 8 】

FIG. 8

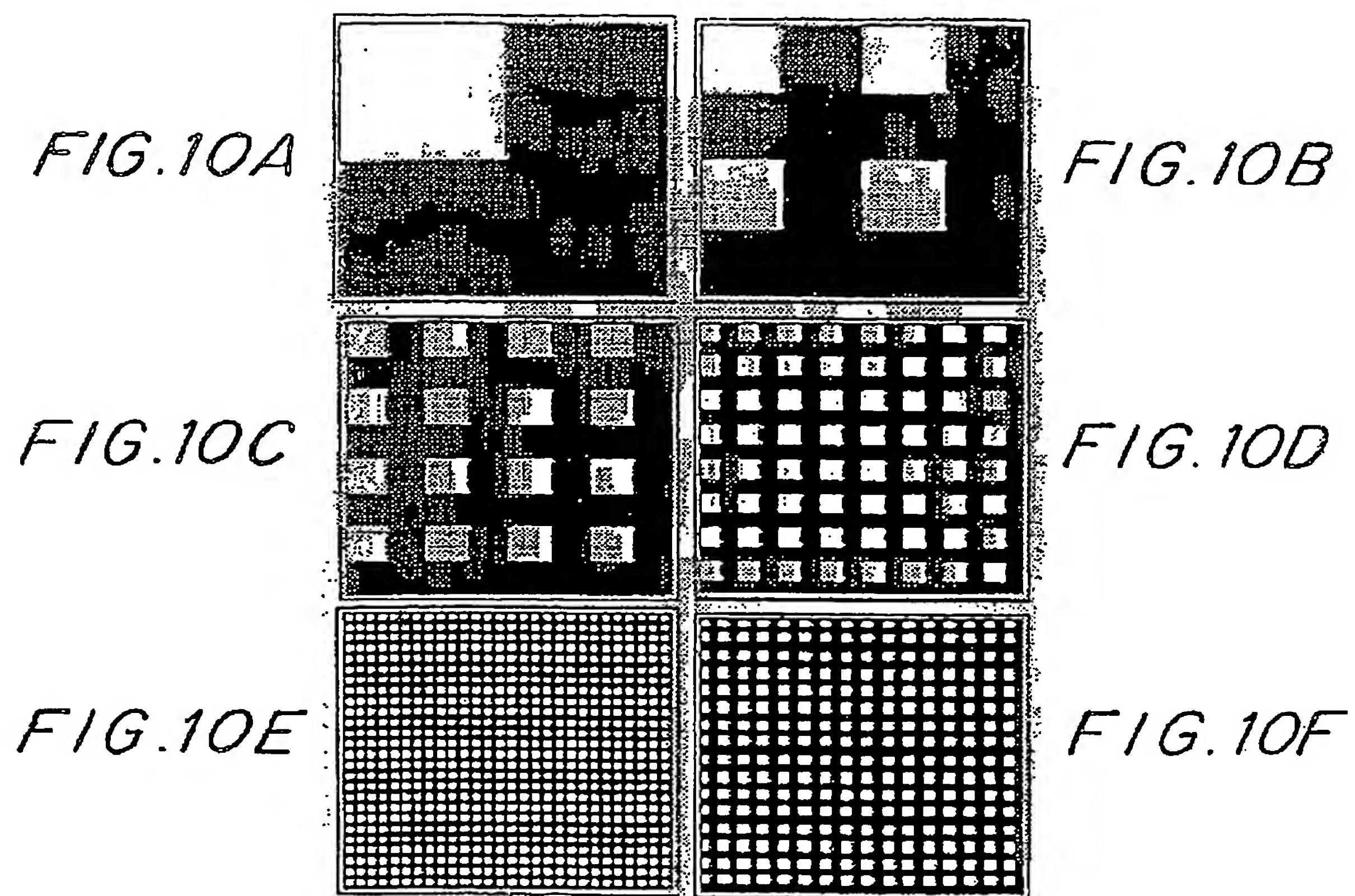


【 図 9 】

FIG. 9

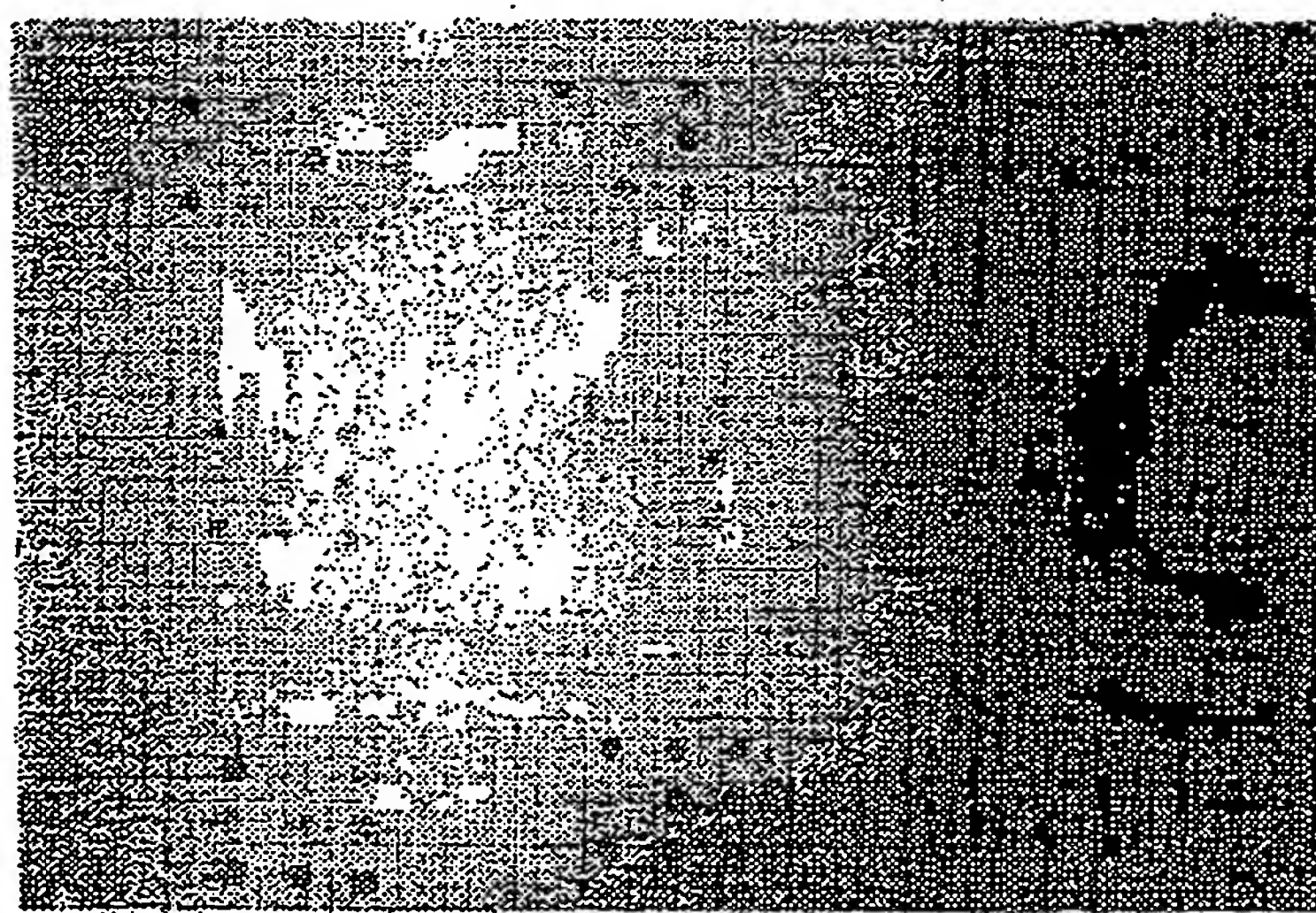


【 図 1 0 】



【 図 1 1 】

FIG. 11



【図 1 2】

FIG. 12A

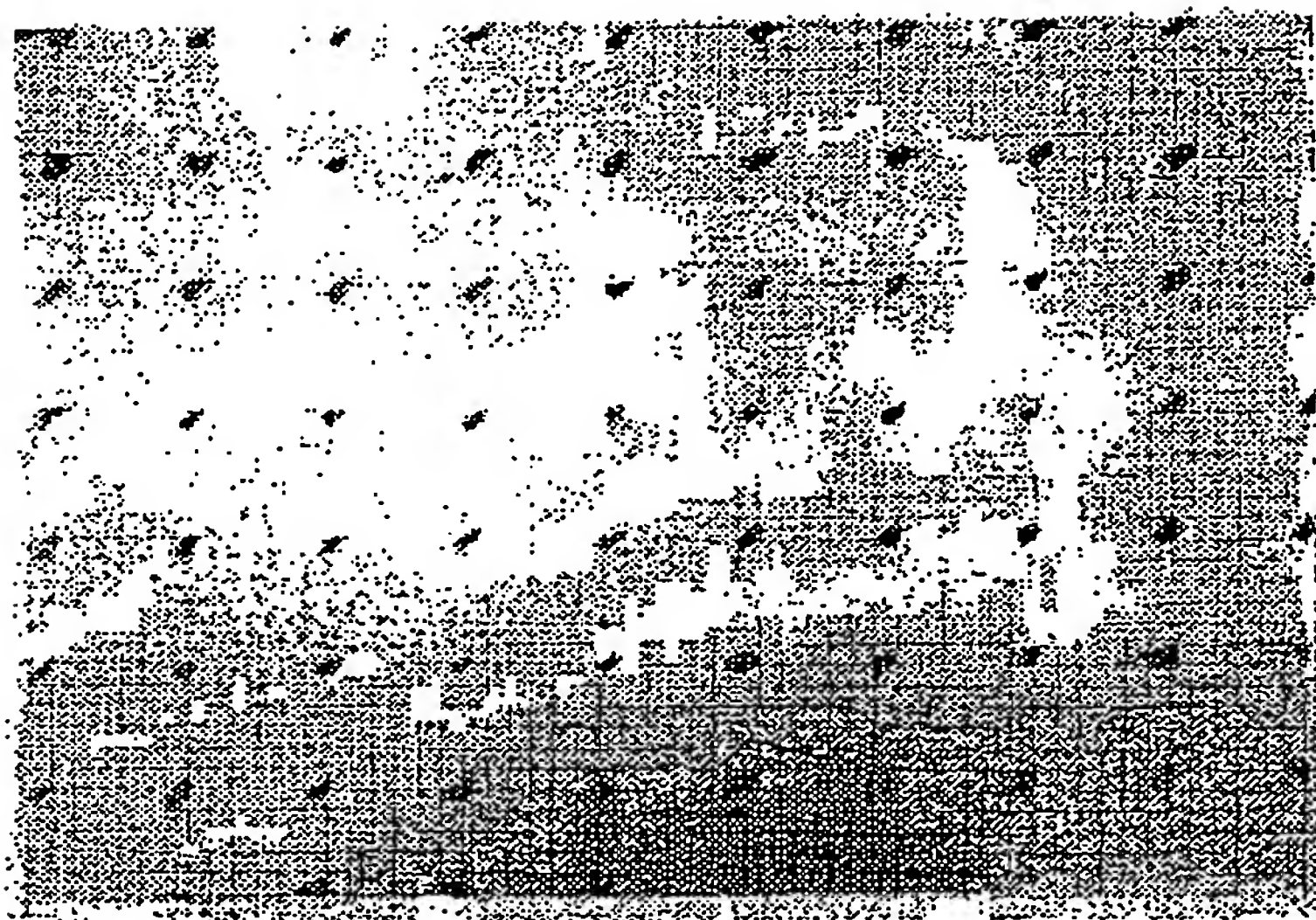
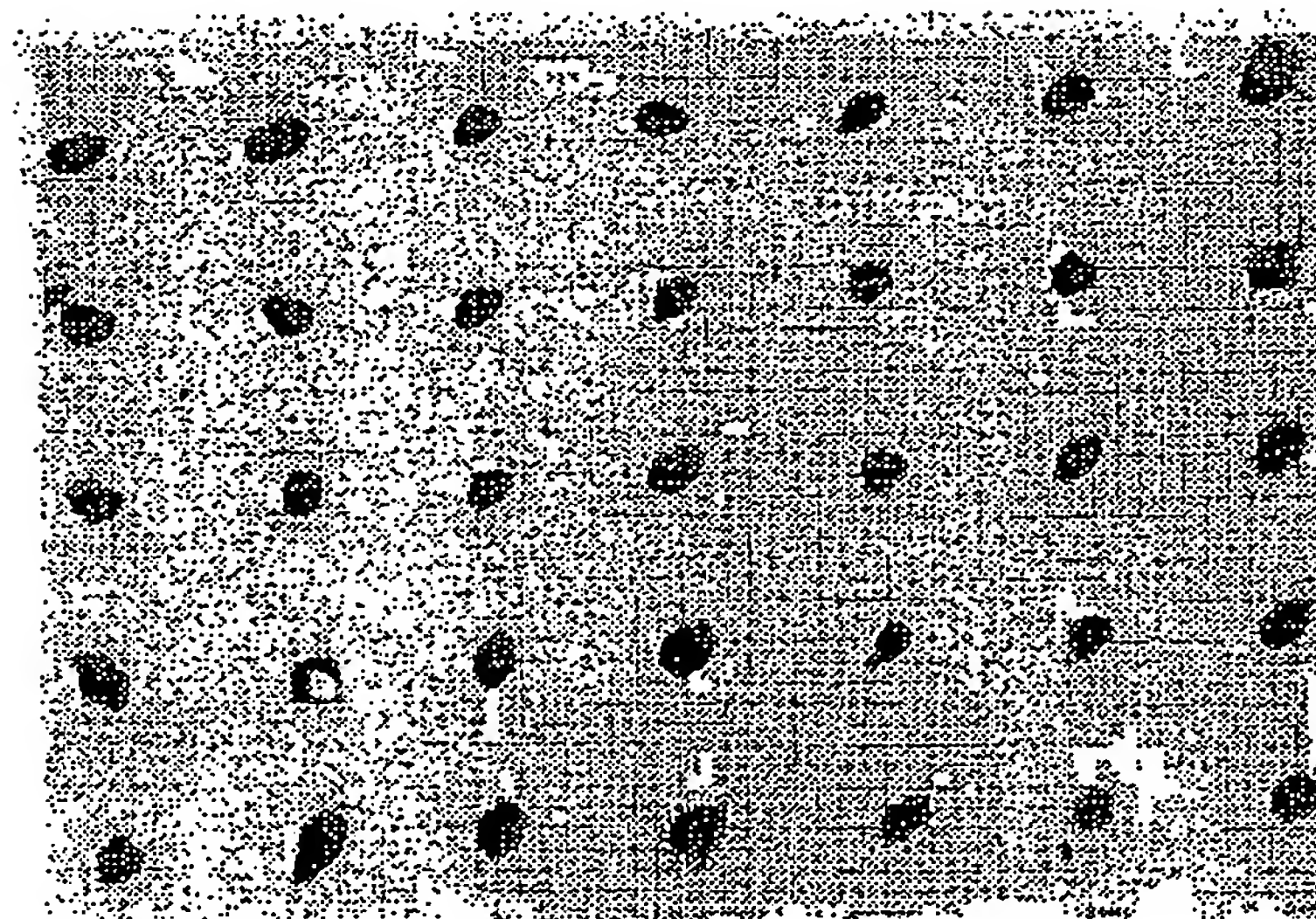
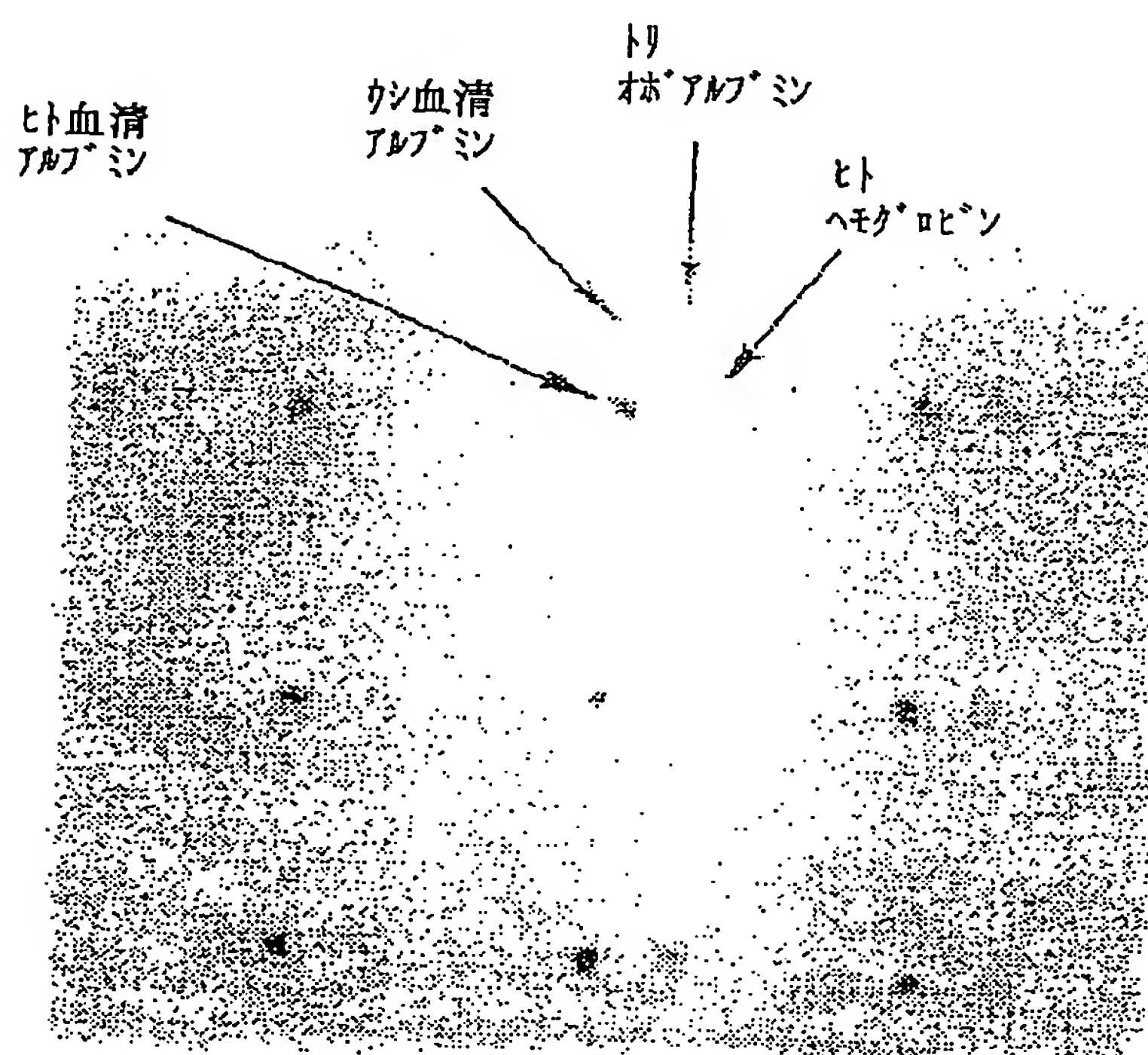


FIG. 12B



【 図 1 3 】

FIG. 13



【 図 1 4 】

FIG. 14A

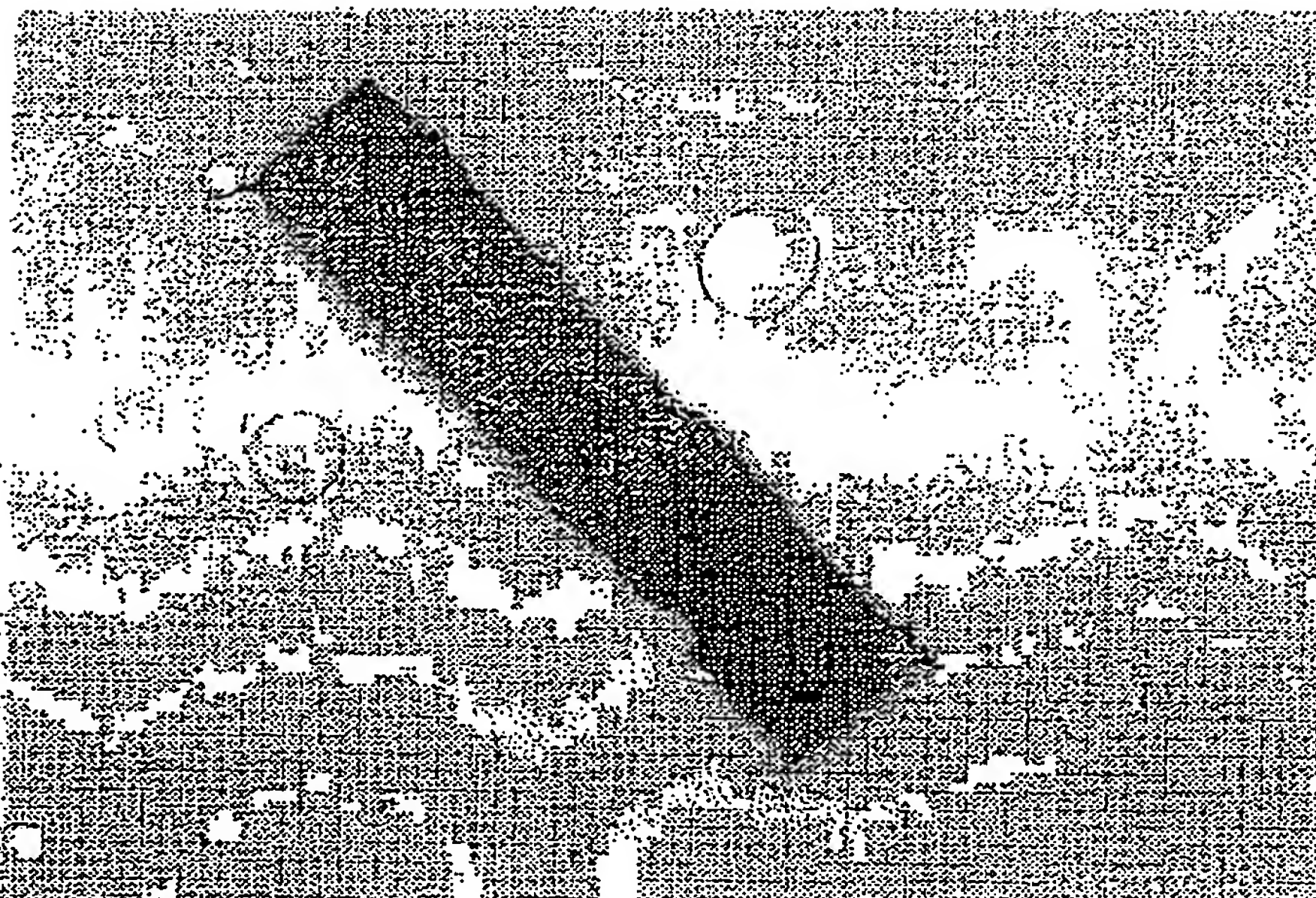
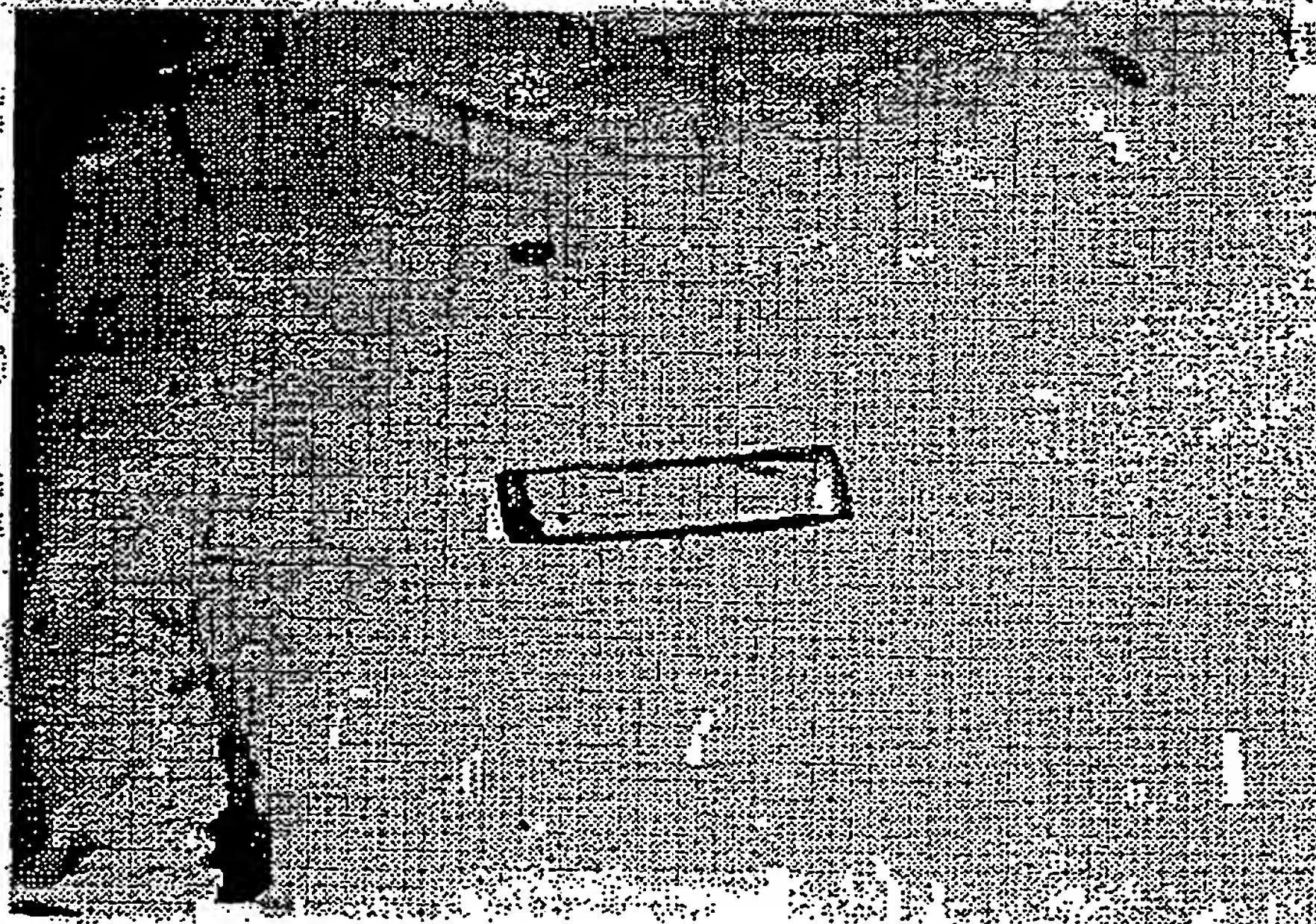


FIG. 14B



【 図 1 5 】

FIG. 15A

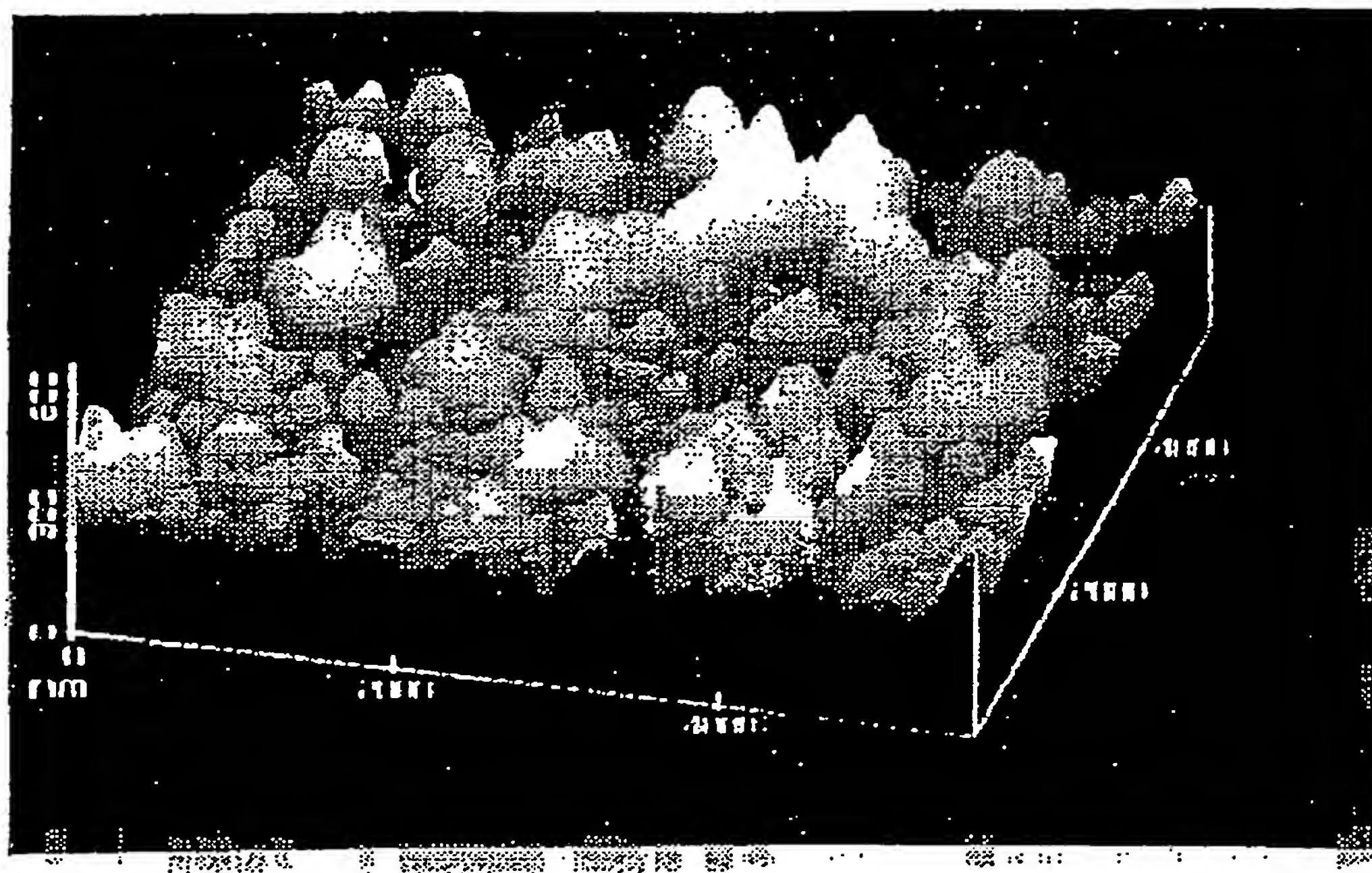
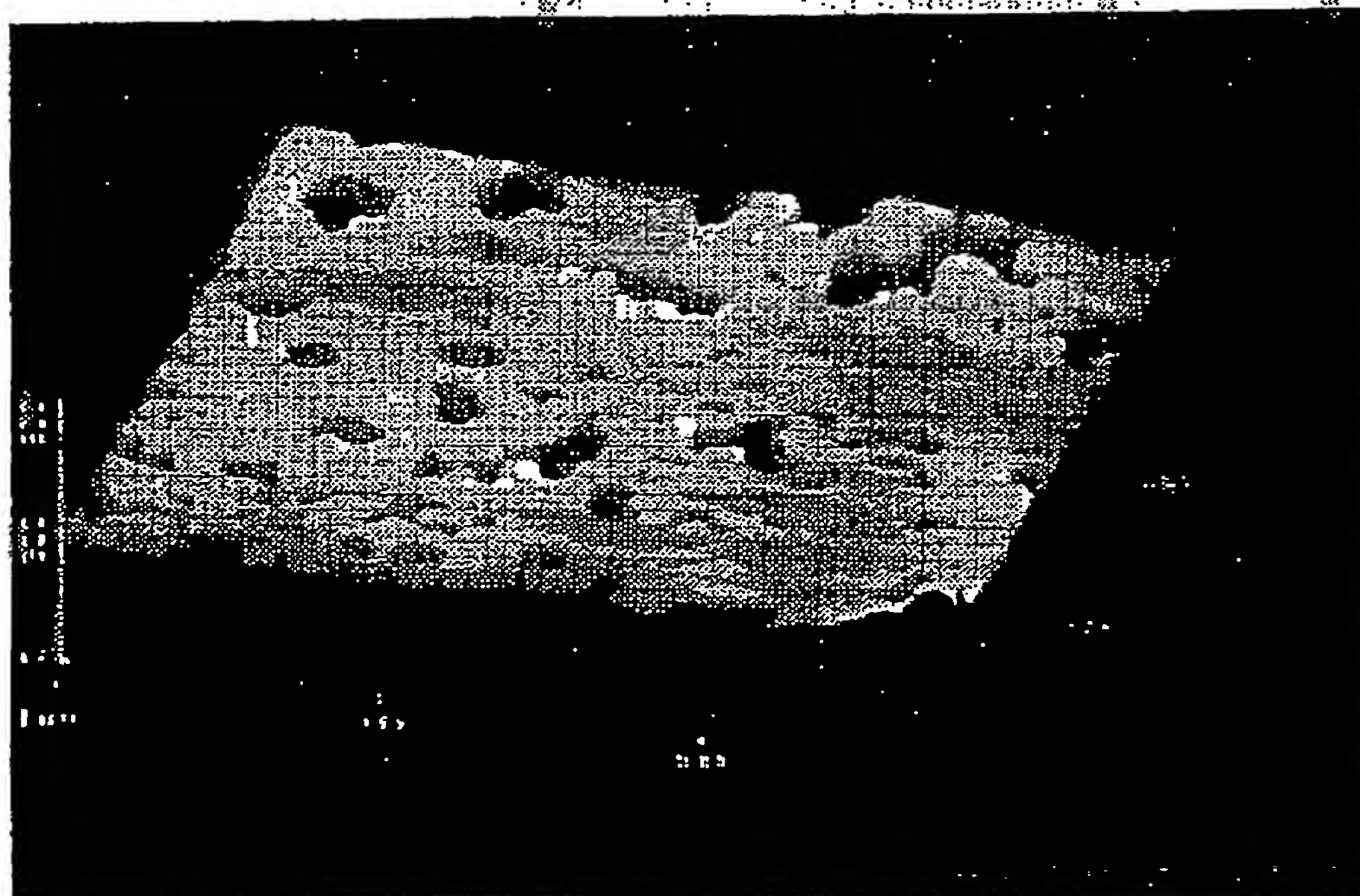
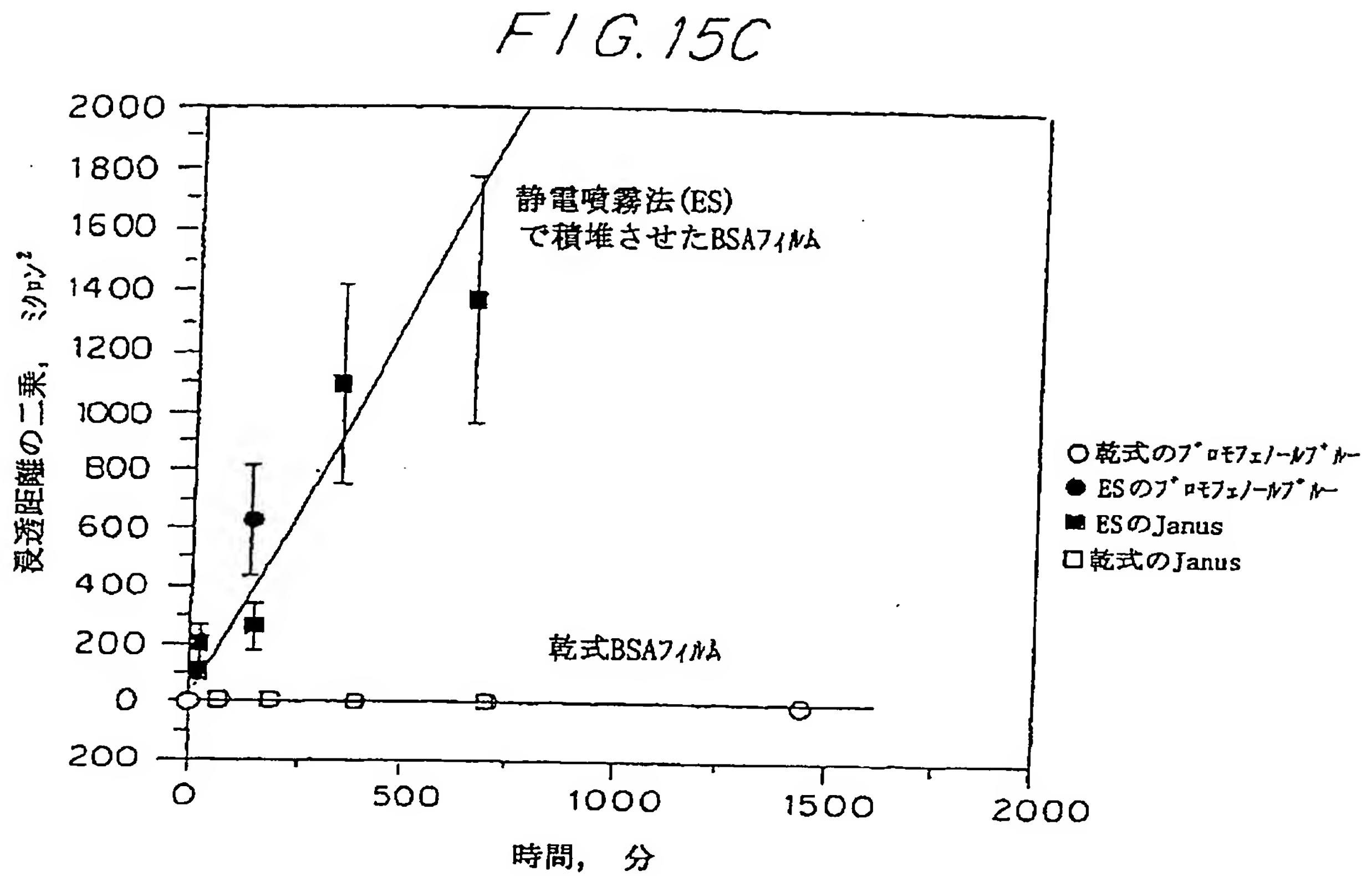


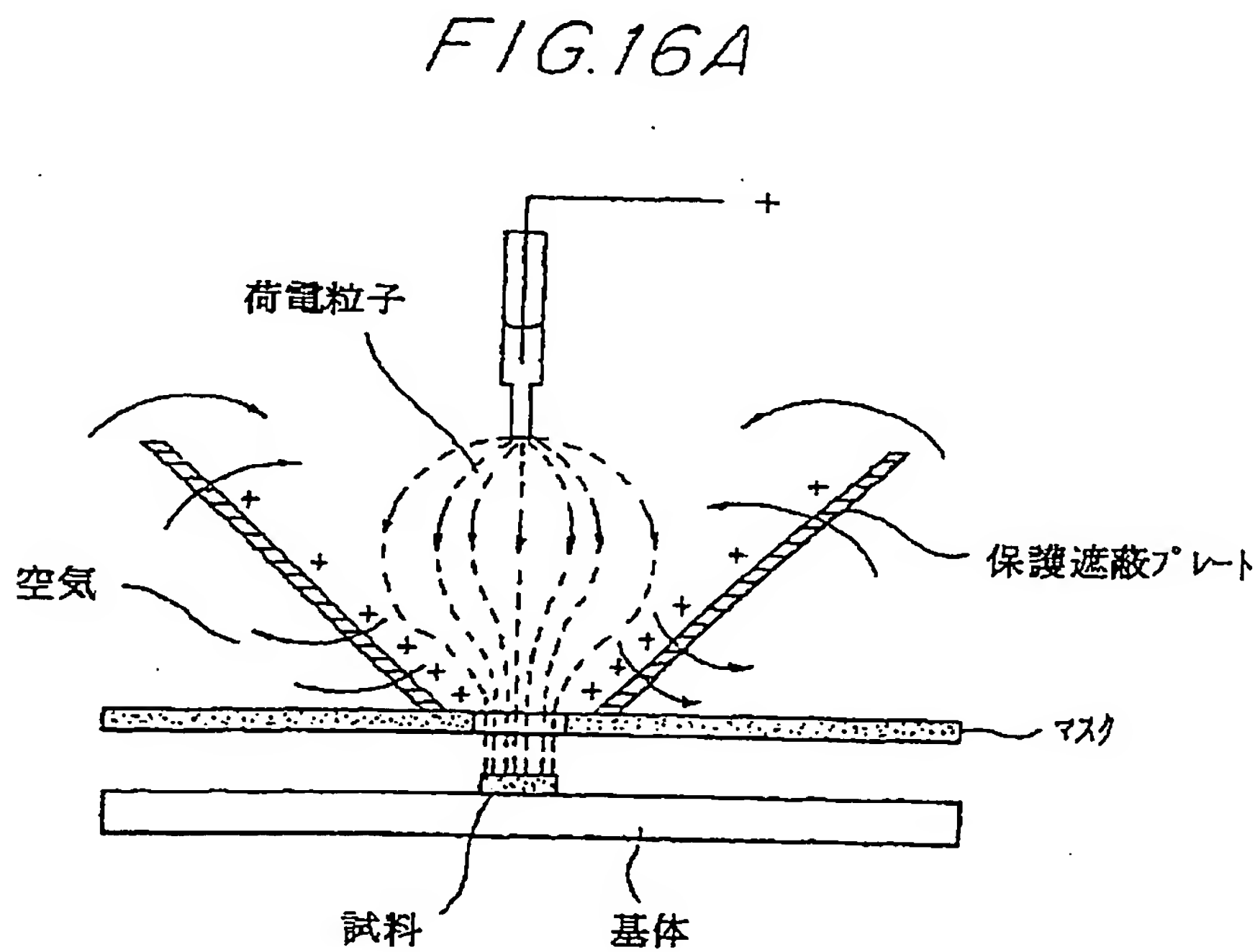
FIG. 15B



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 1 6 】

FIG. 16B

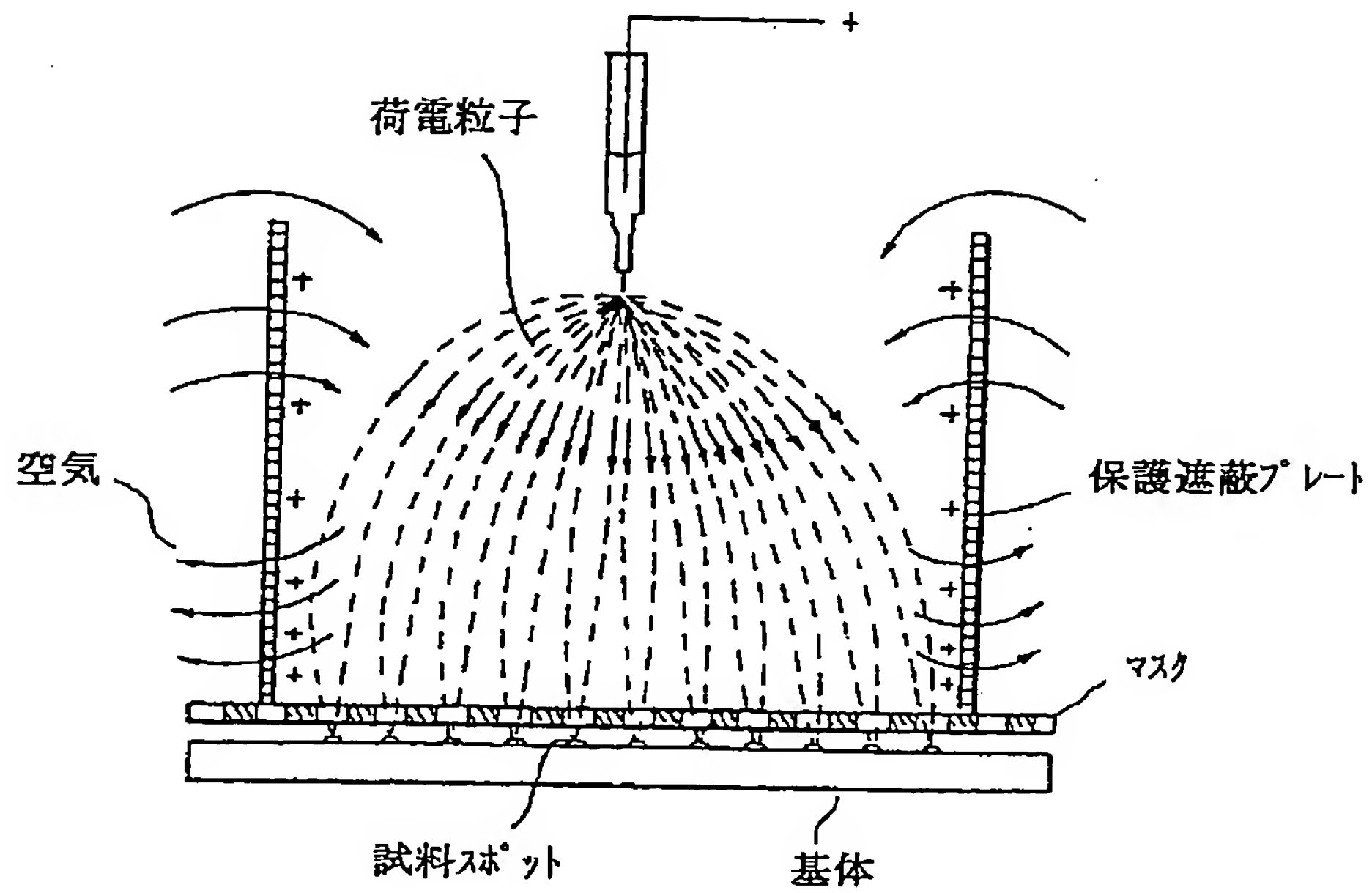
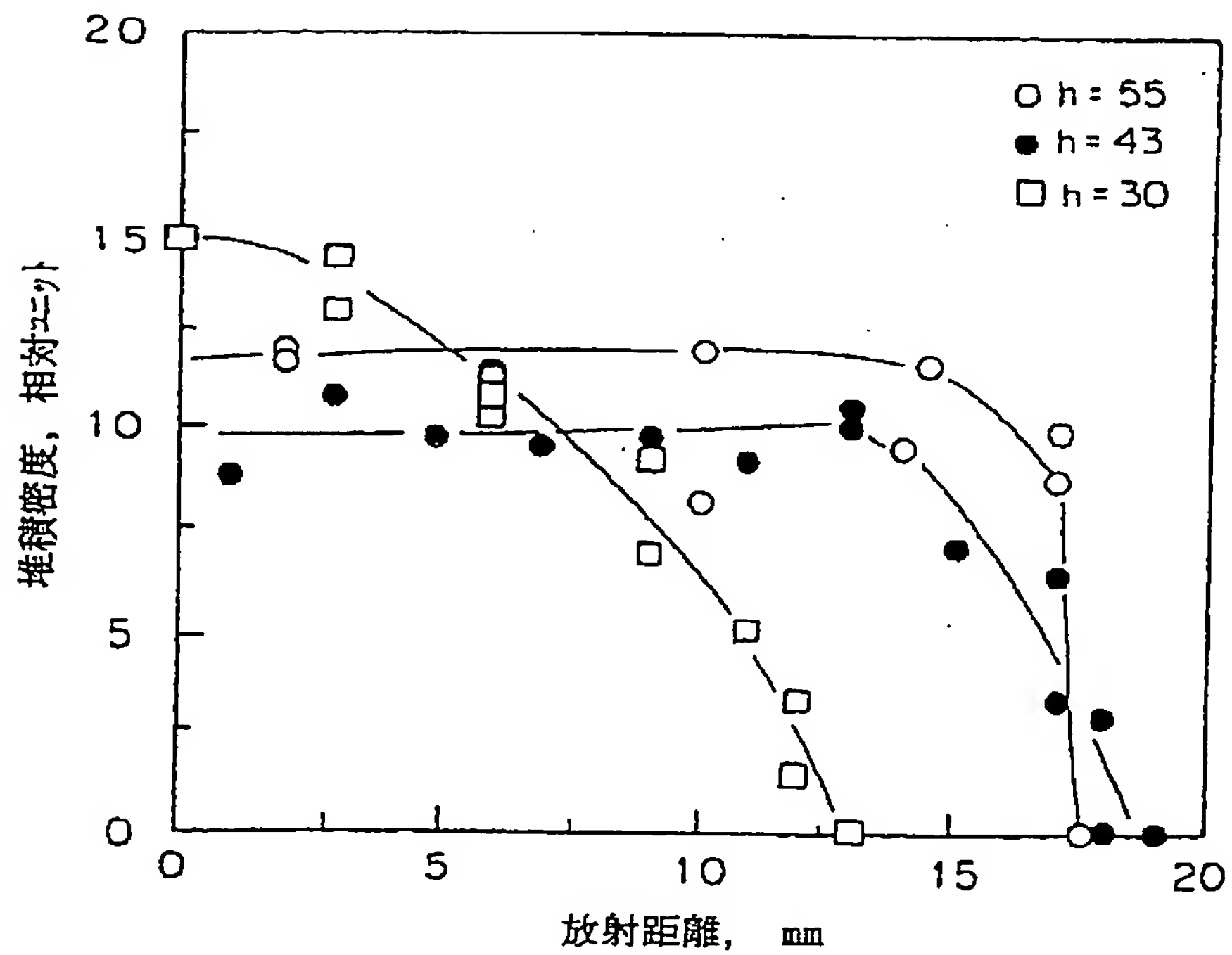
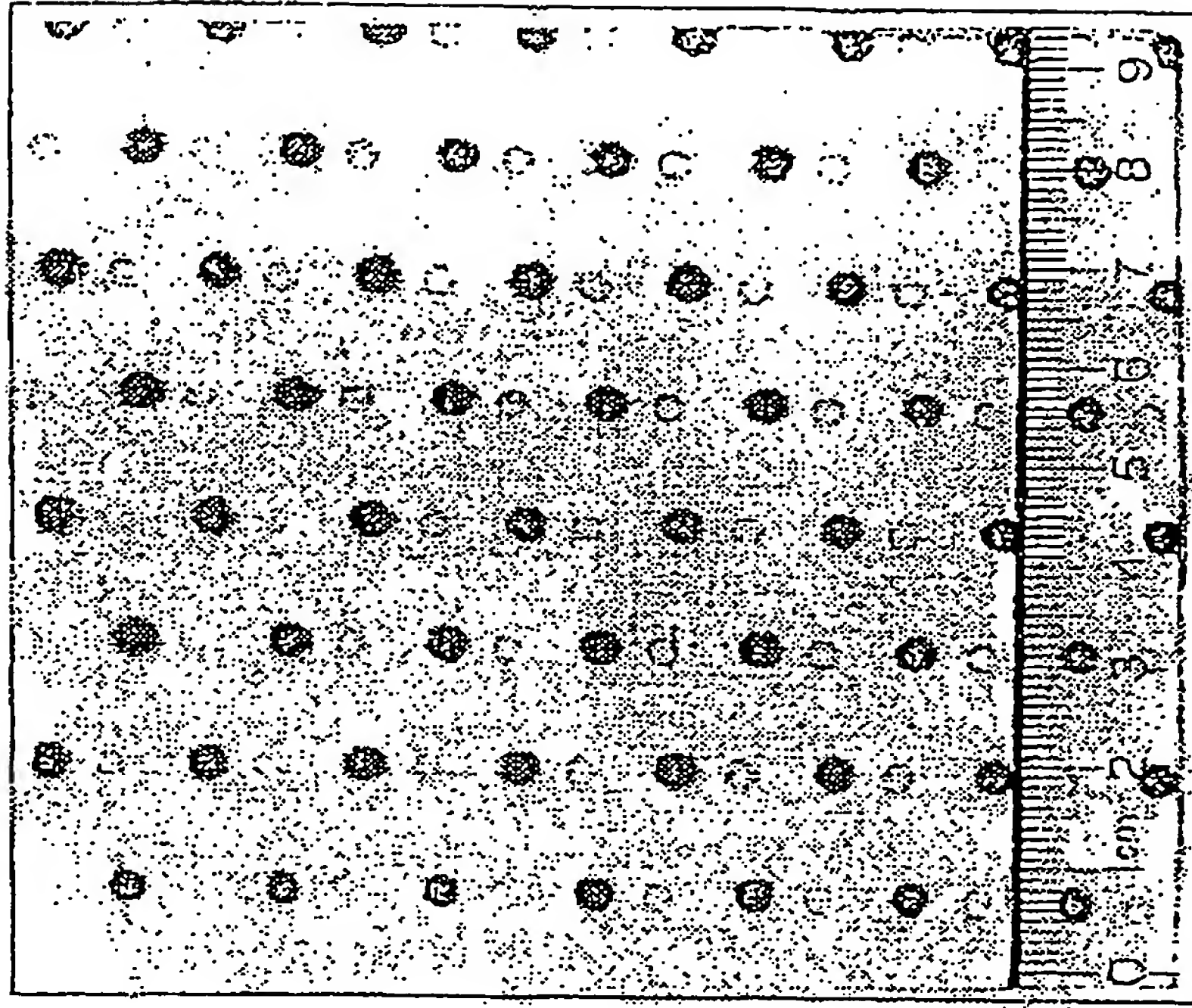


FIG. 16C



【 図 1 7 】

FIG. 17



【 図 18 】

FIG. 18A

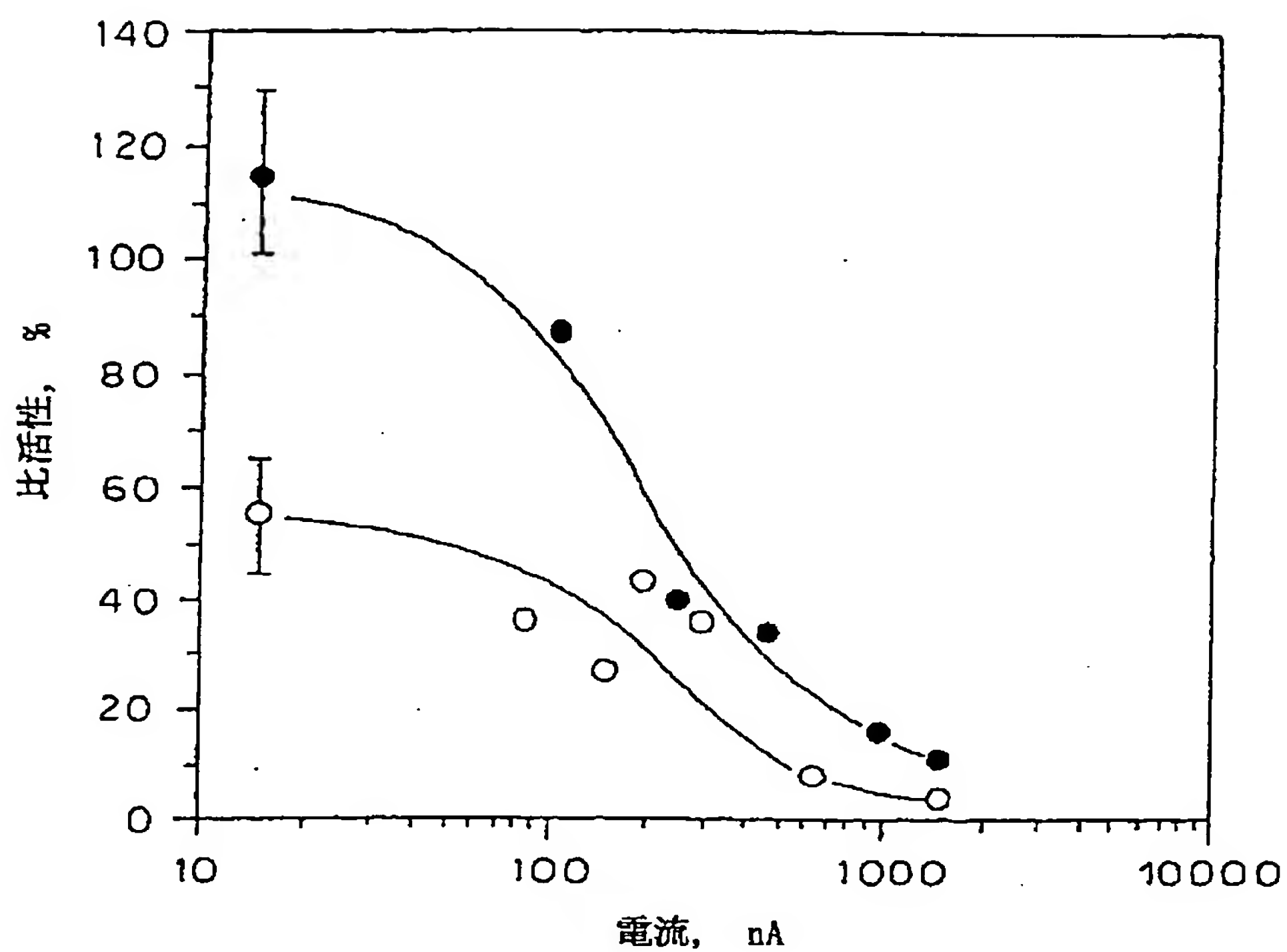
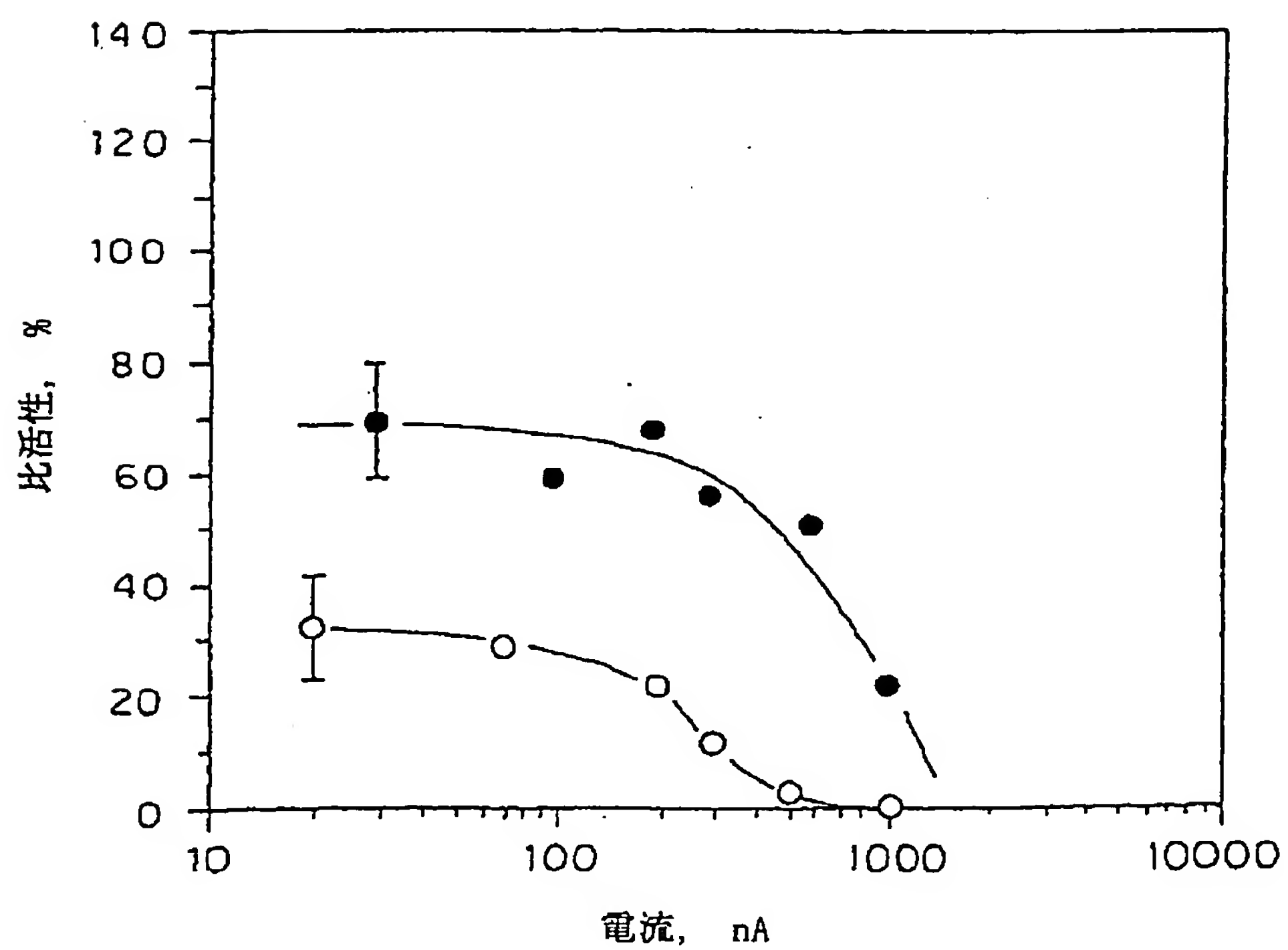
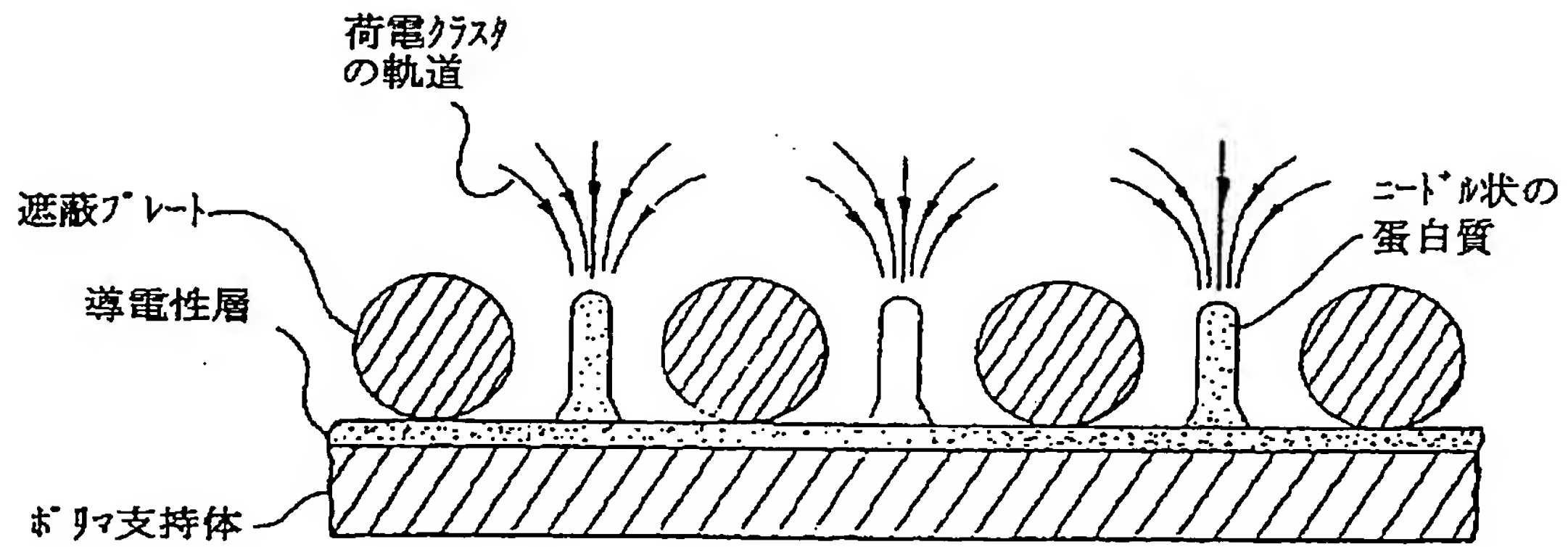


FIG. 18B



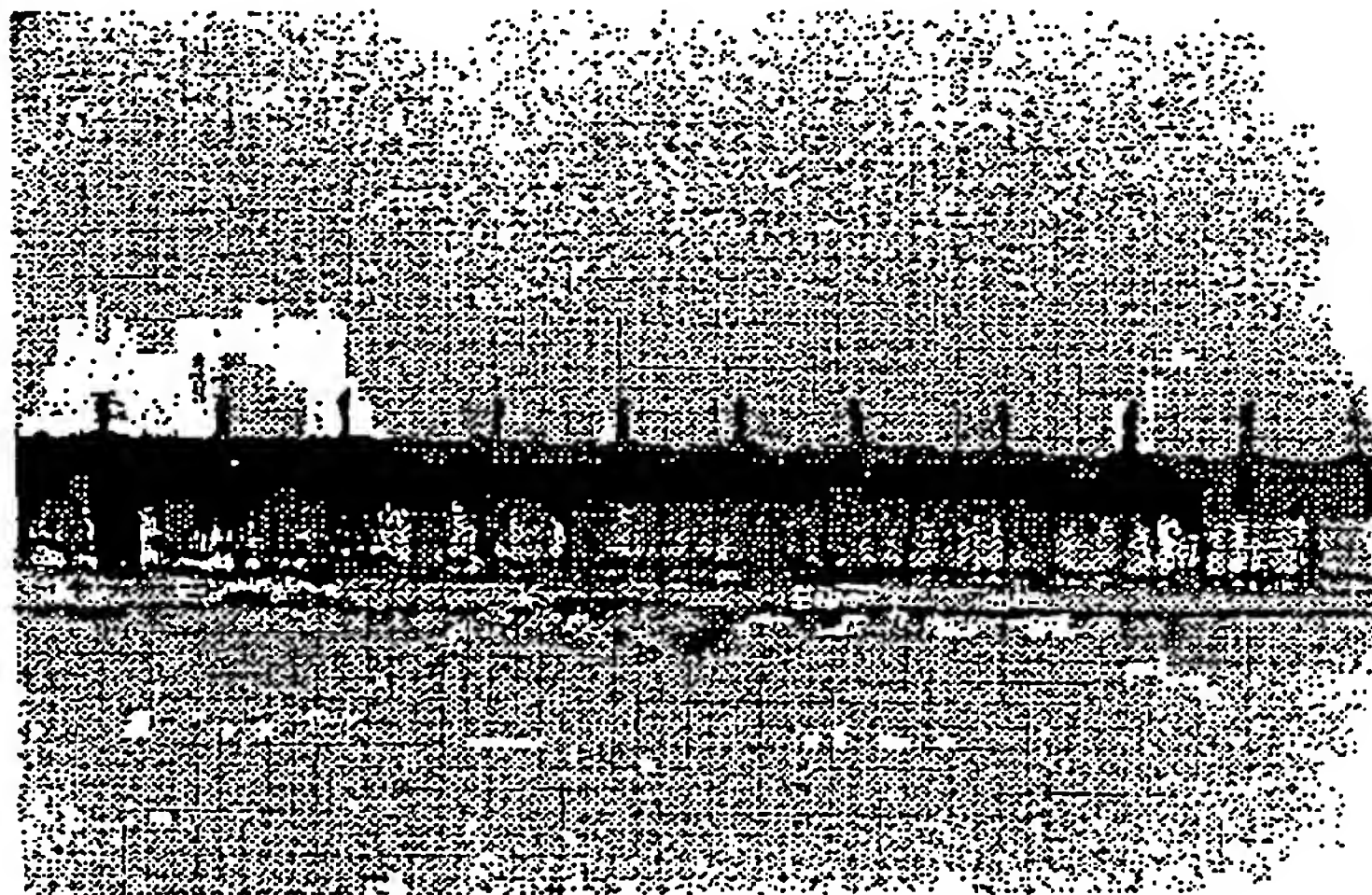
【図19】

FIG. 19A



【図19】

FIG. 19B



【 図 2 0 】

FIG. 20A

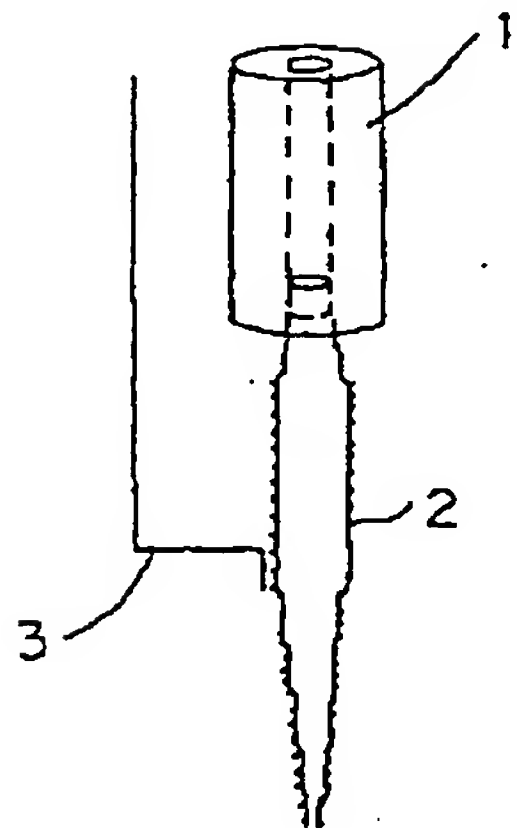


FIG. 20B

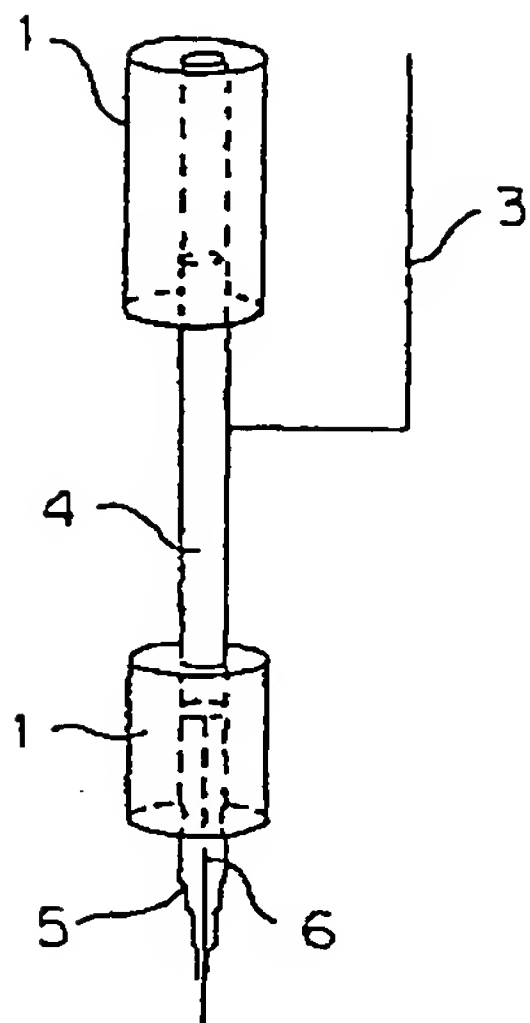
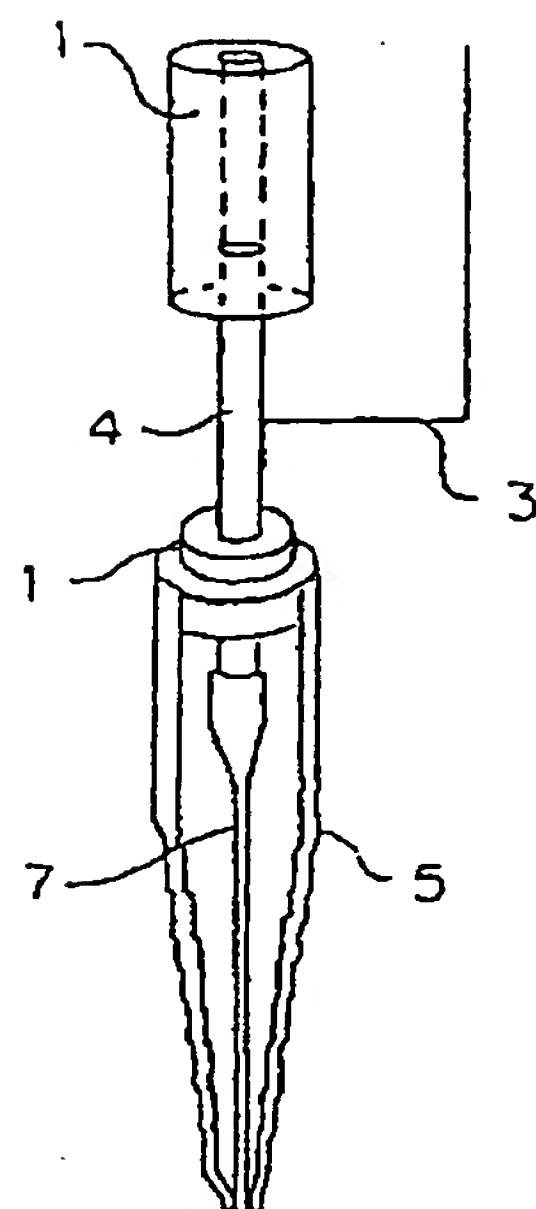


FIG. 20C



【 図 2 1 】

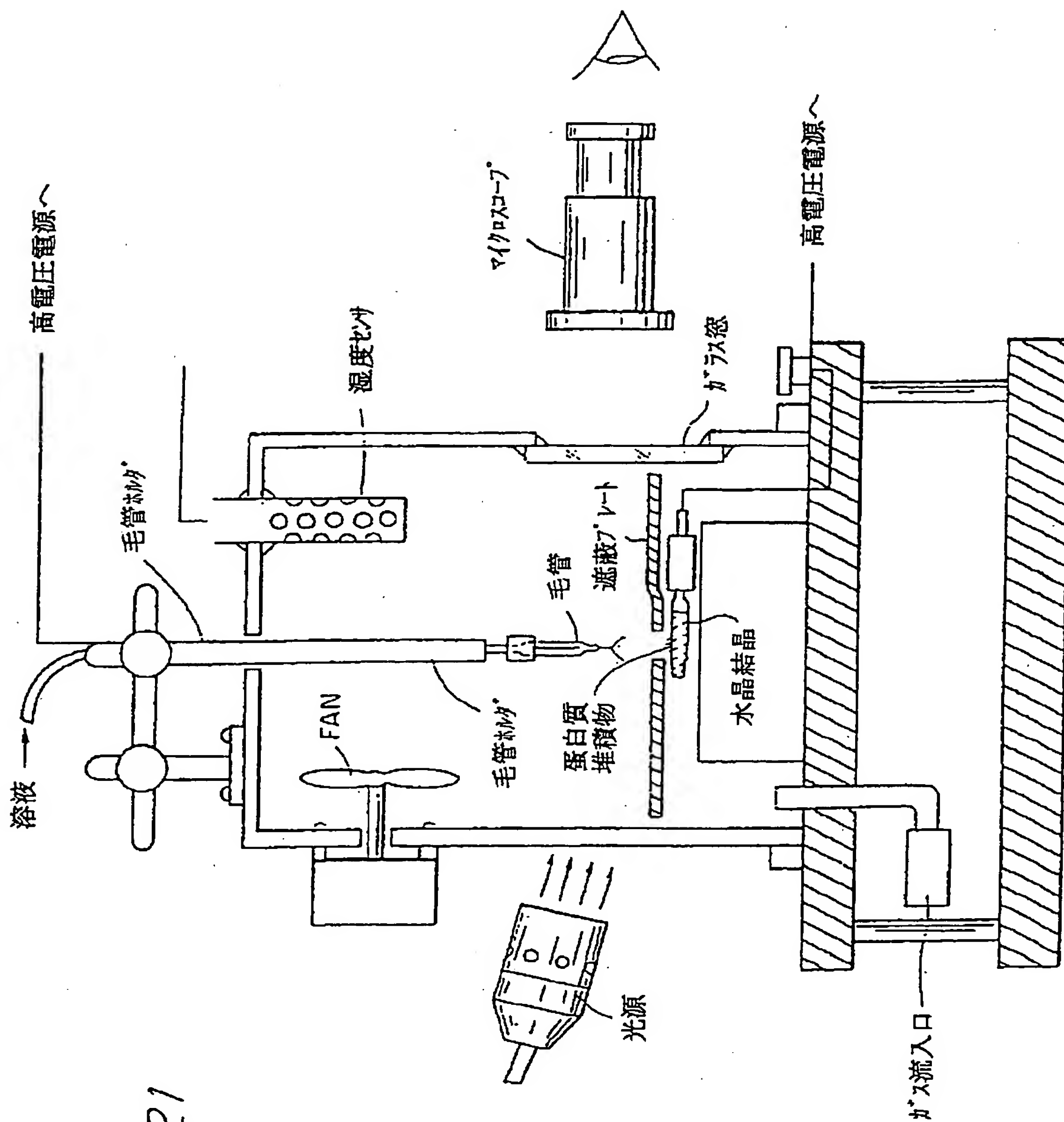
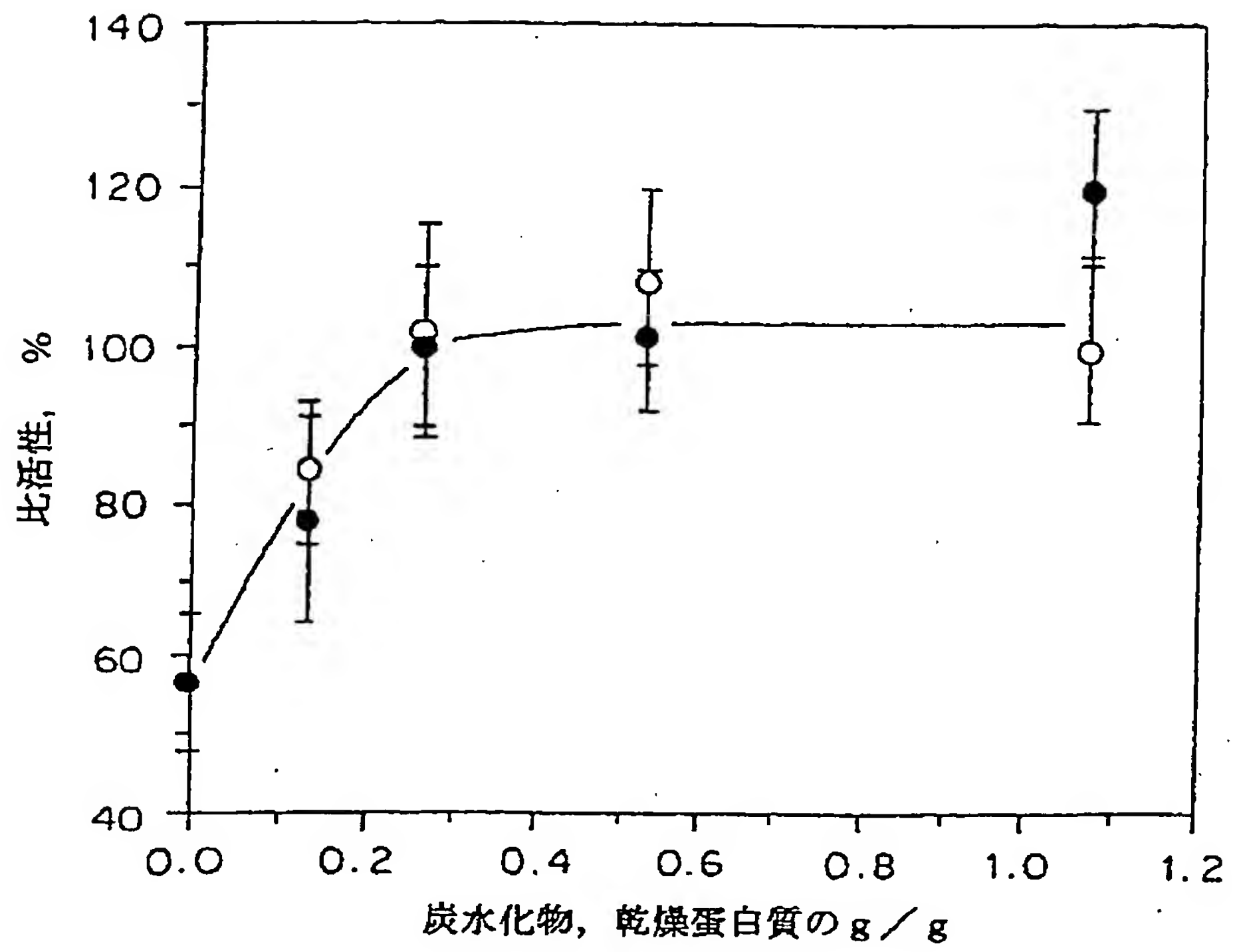


FIG. 21

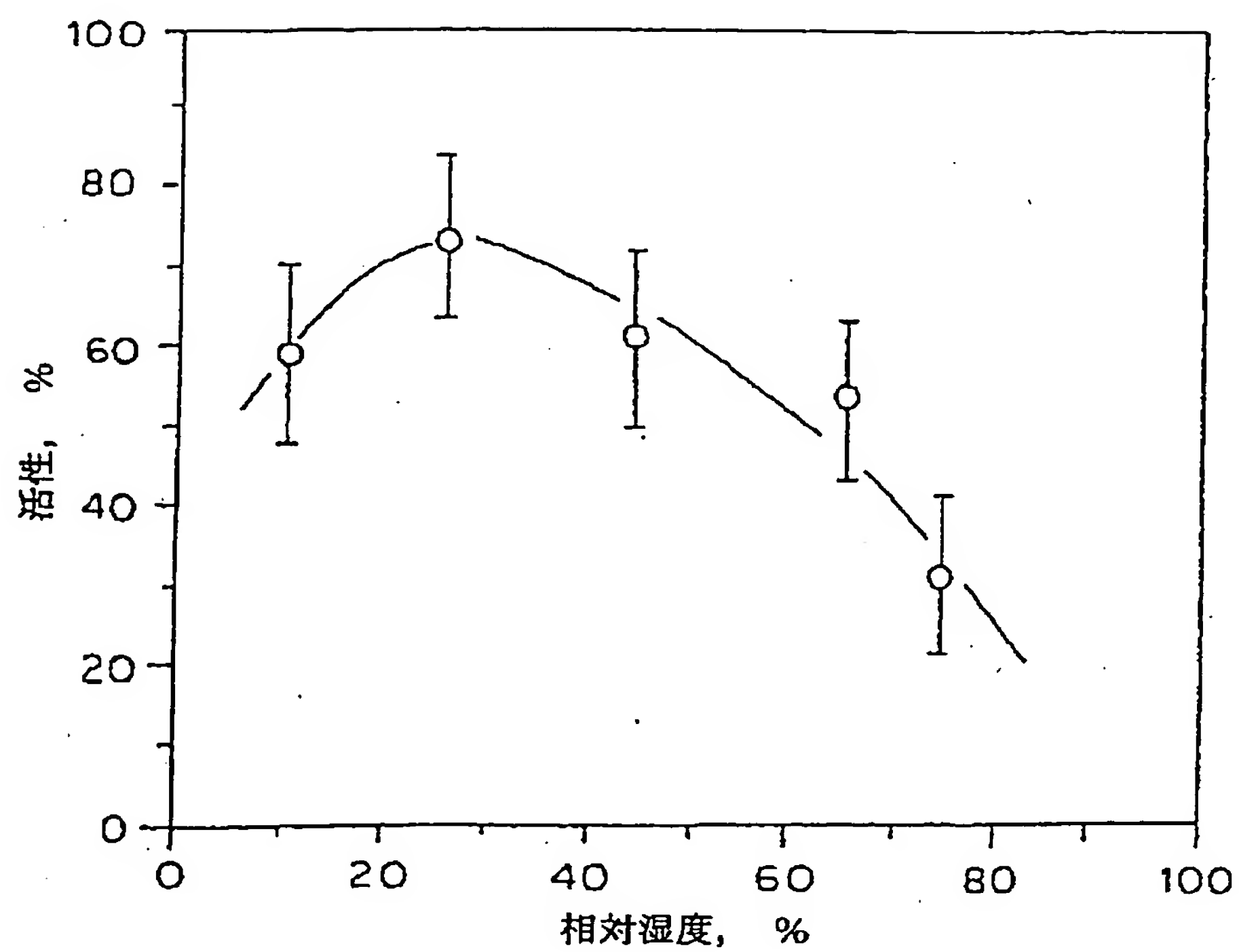
【 図 2 2 】

FIG. 22



【 図 2 3 】

FIG. 23



【 図 2 4 】

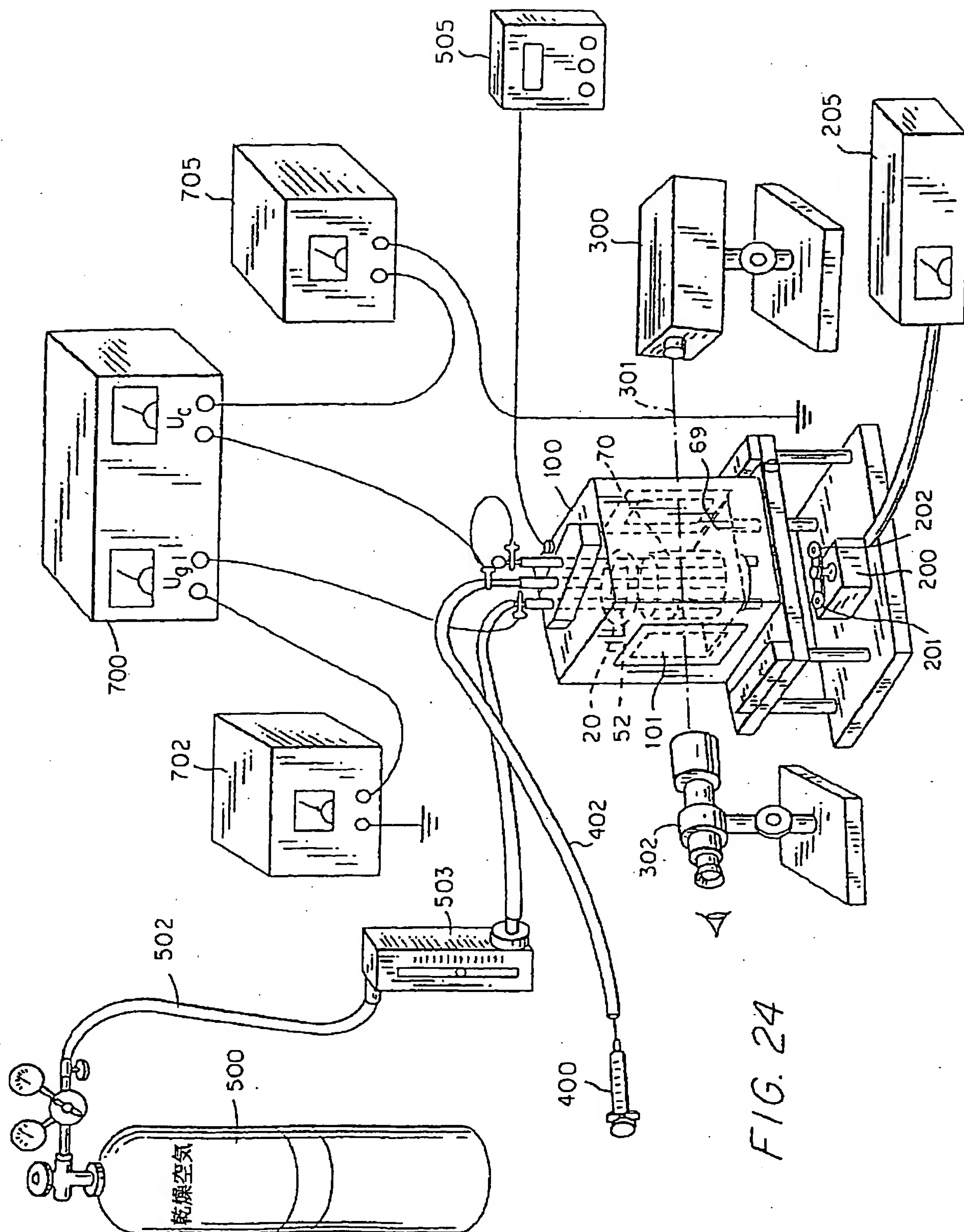
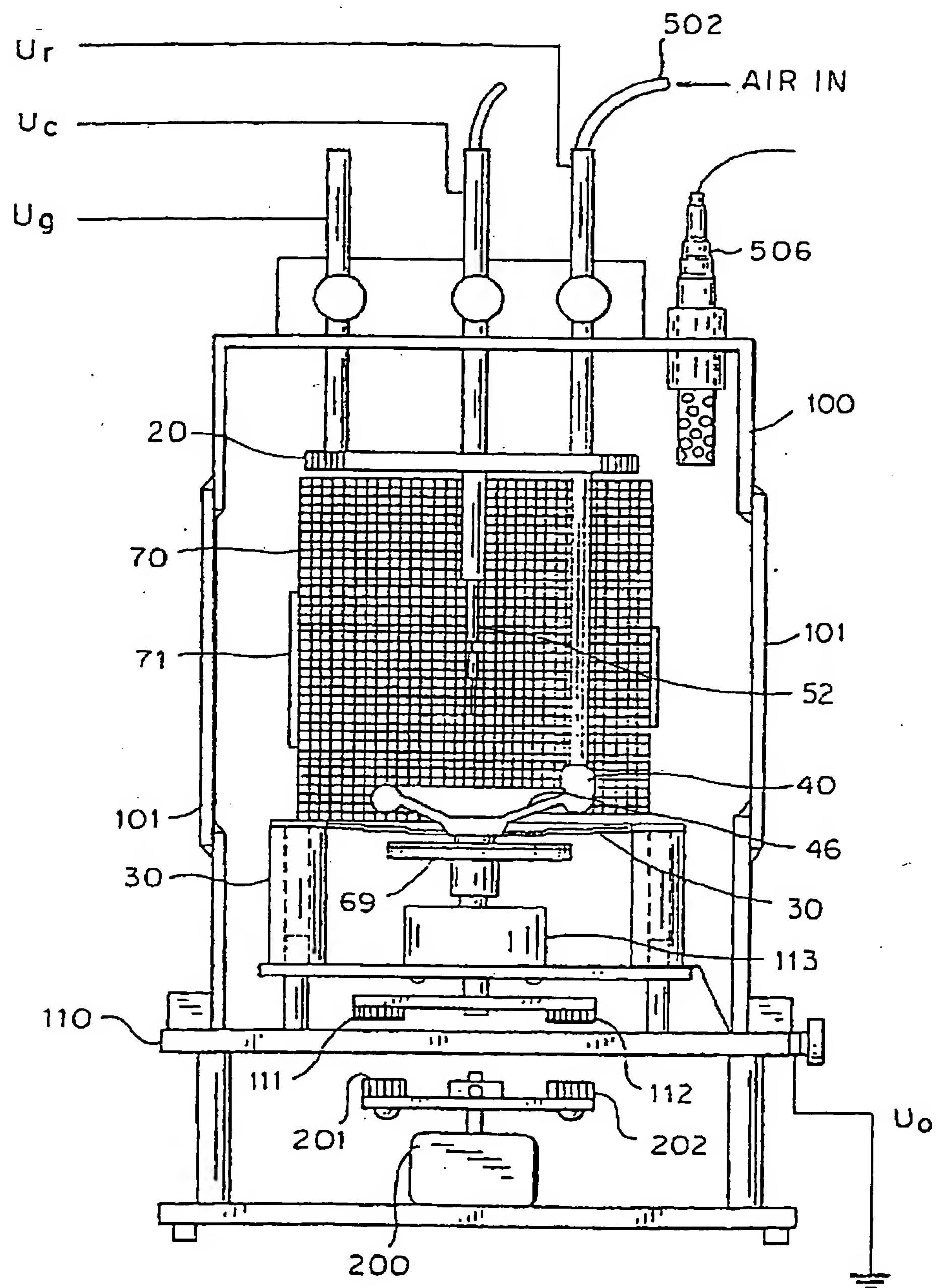


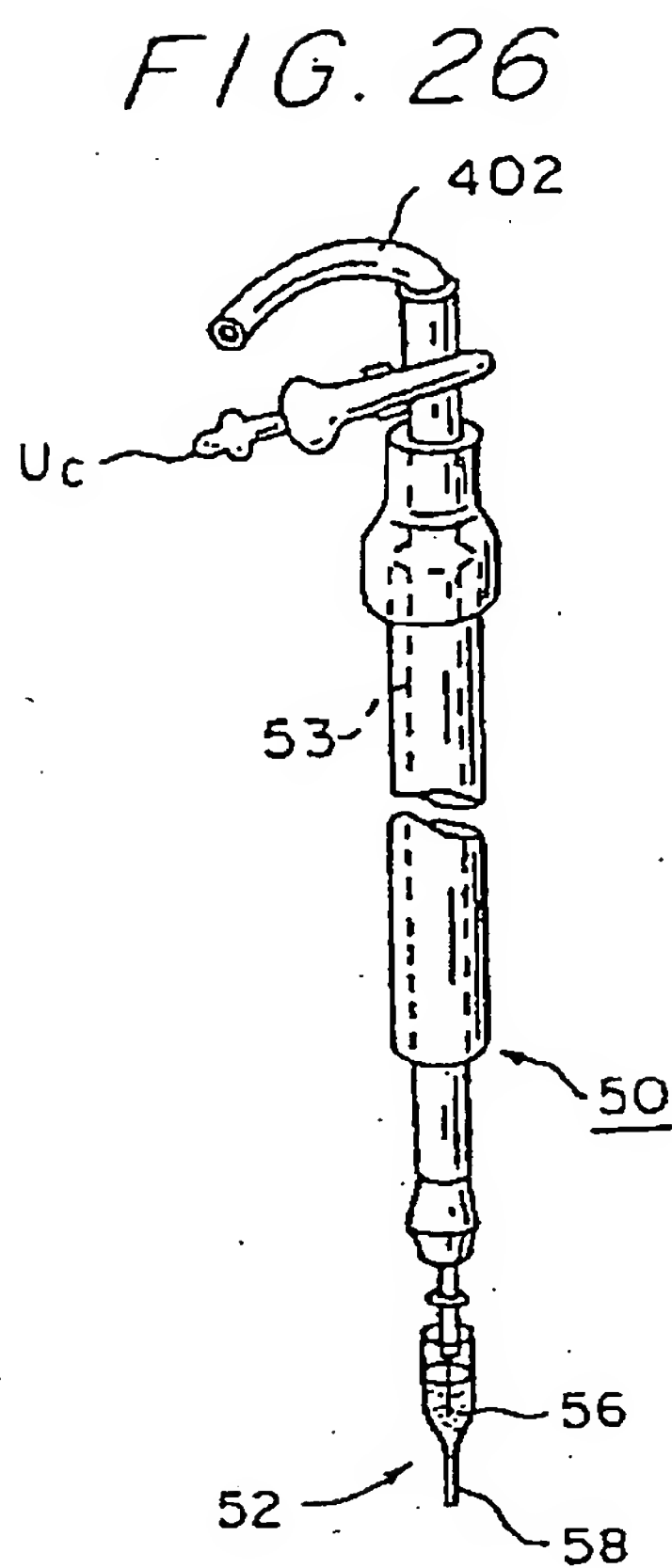
FIG. 24

【 図 2 5 】

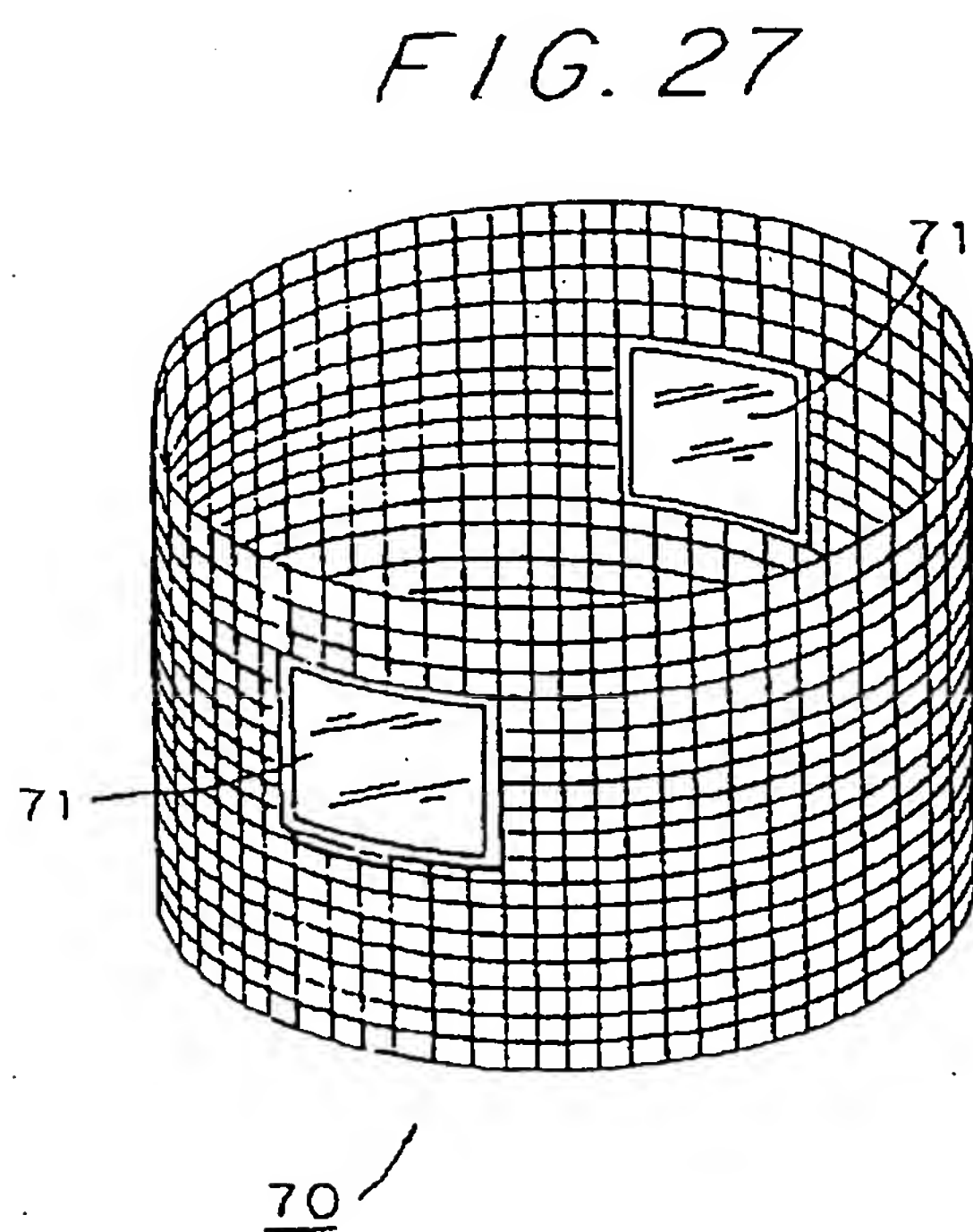
FIG. 25



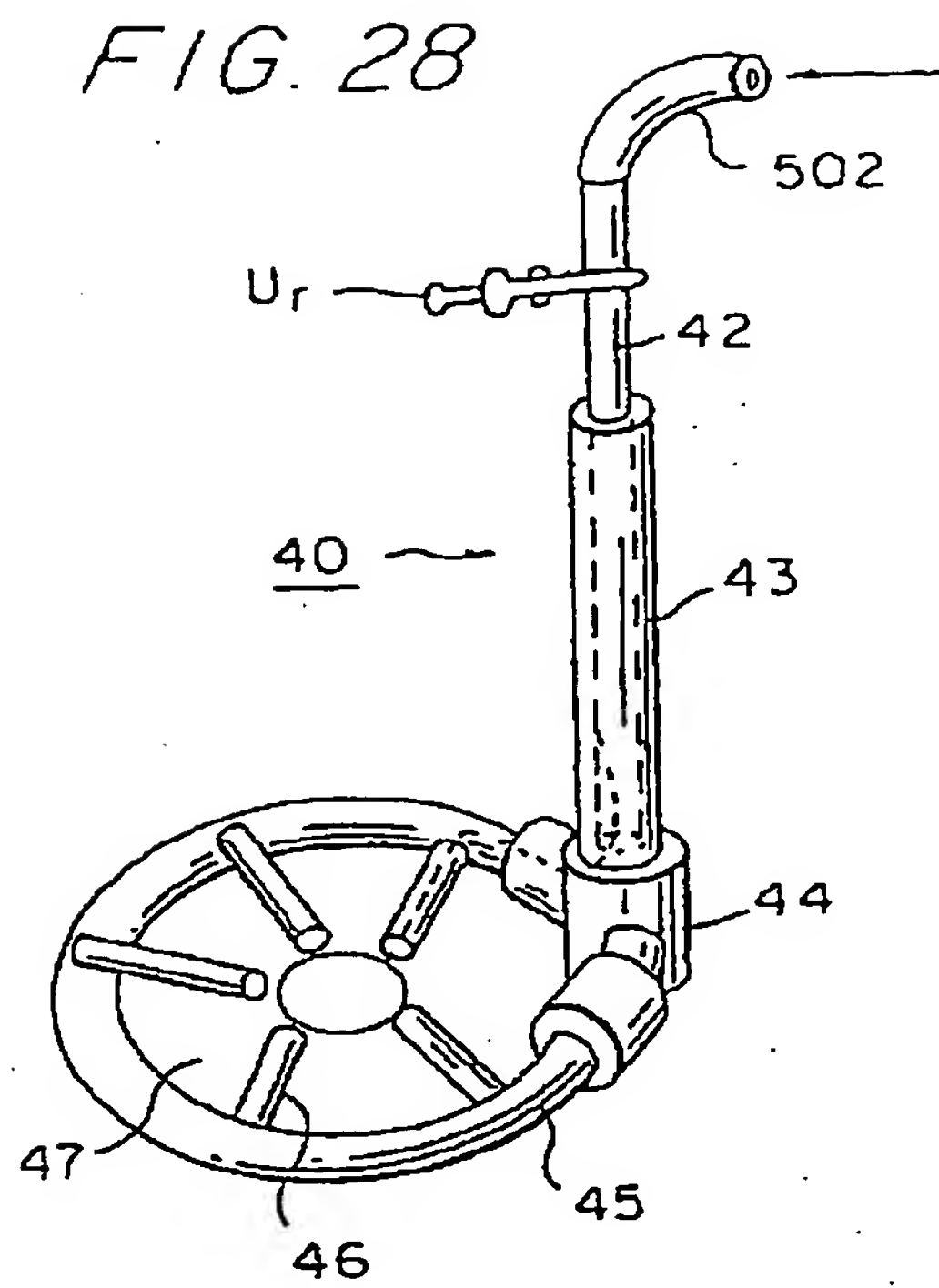
【 図 2 6 】



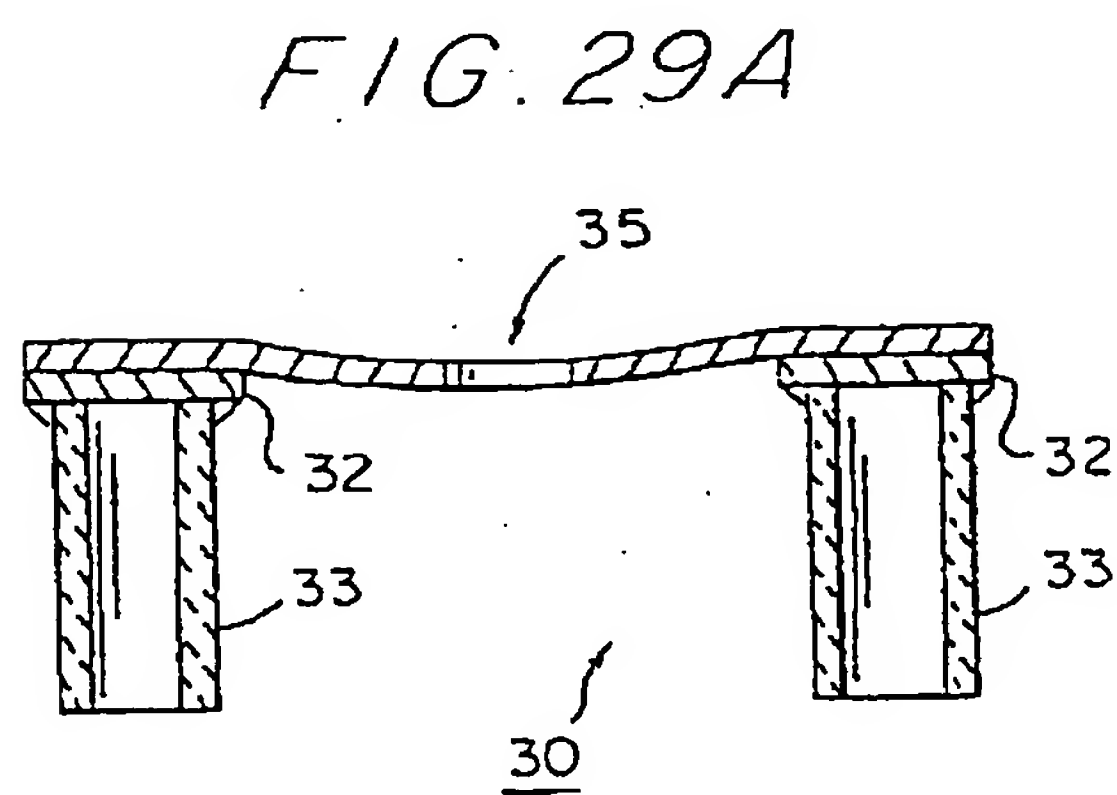
【 図 2 7 】



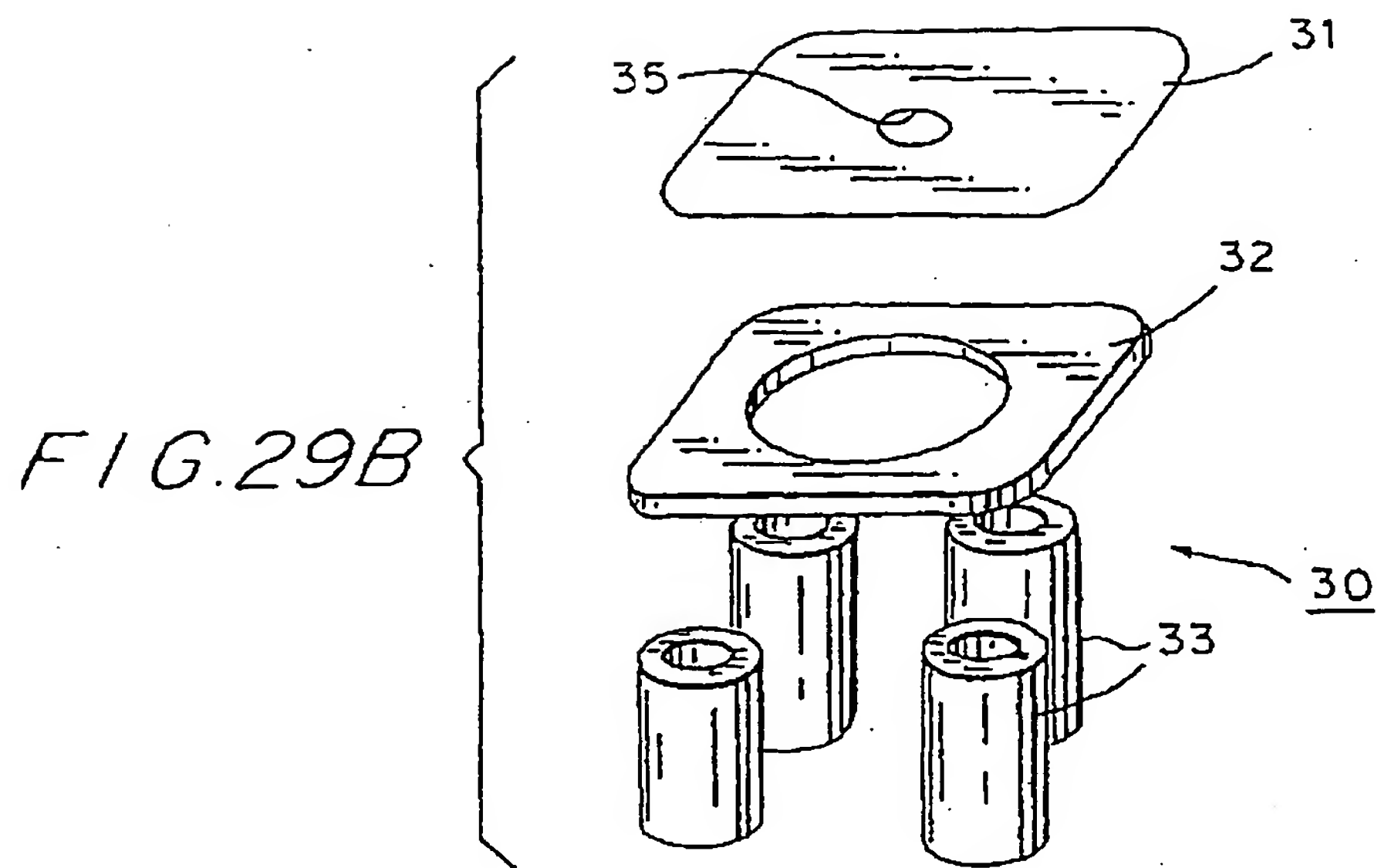
【 図 2 8 】



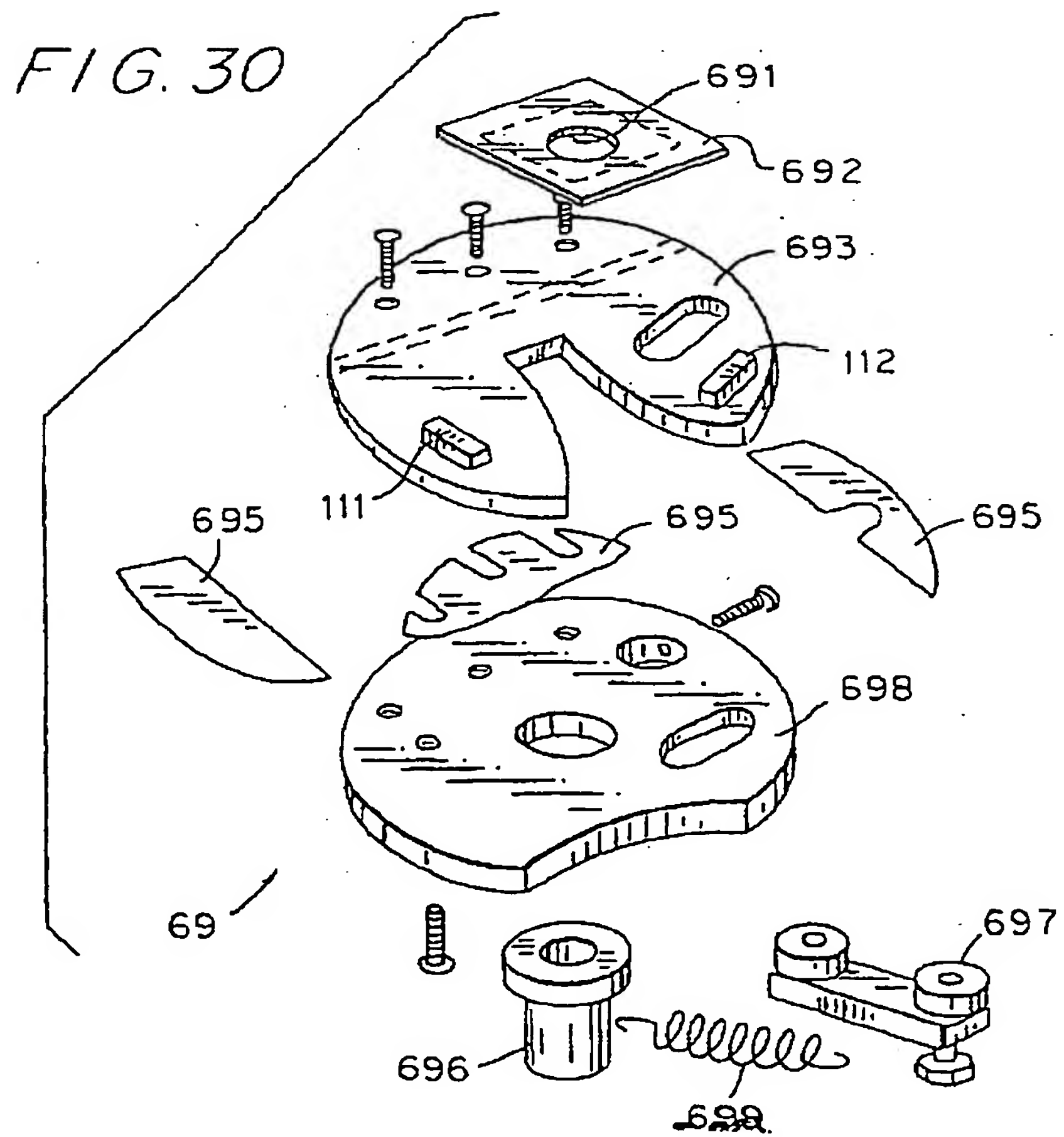
【 図 2 9 】



【 図 2 9 】

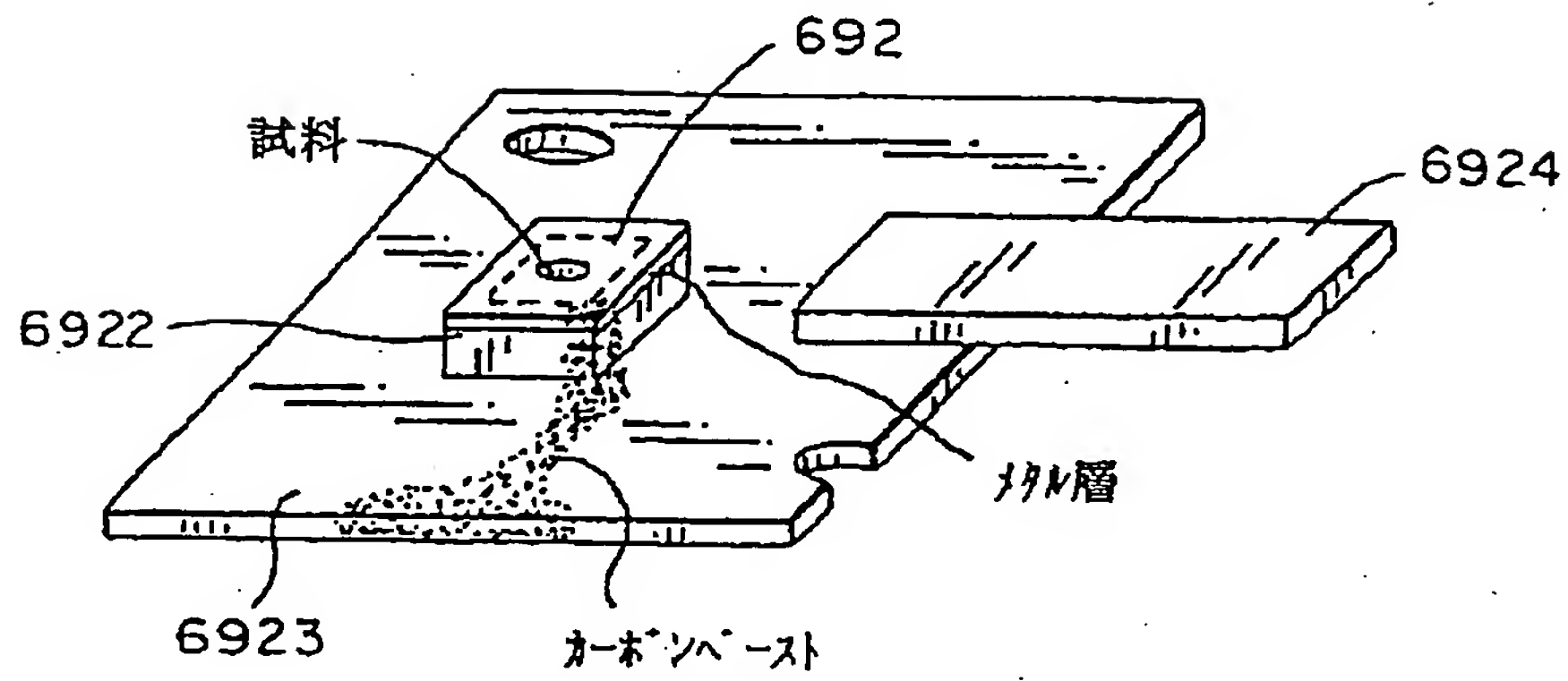


【 図 3 0 】



【 図 3 1 】

FIG. 31



【 図 3 2 】

FIG. 32A

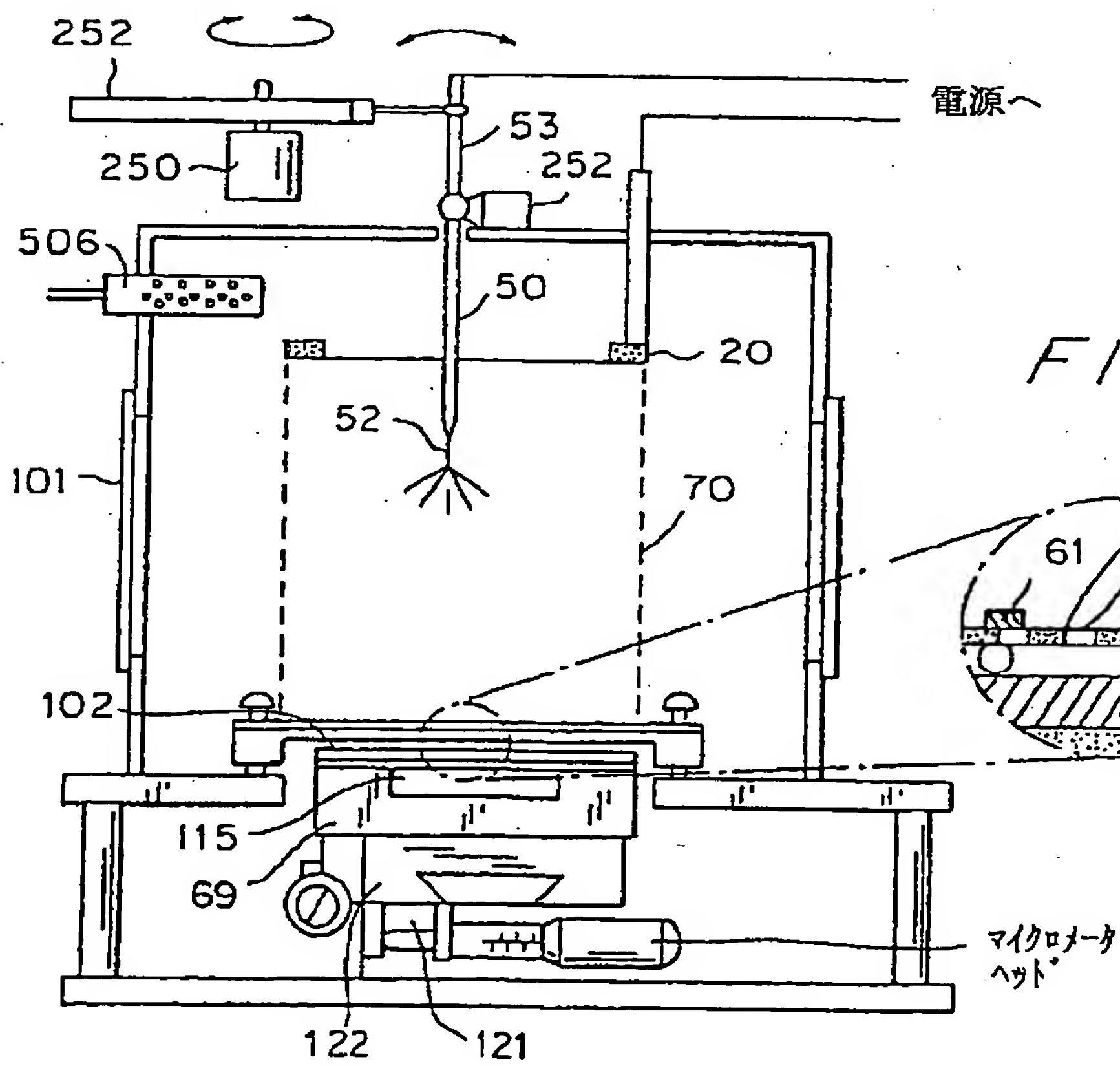
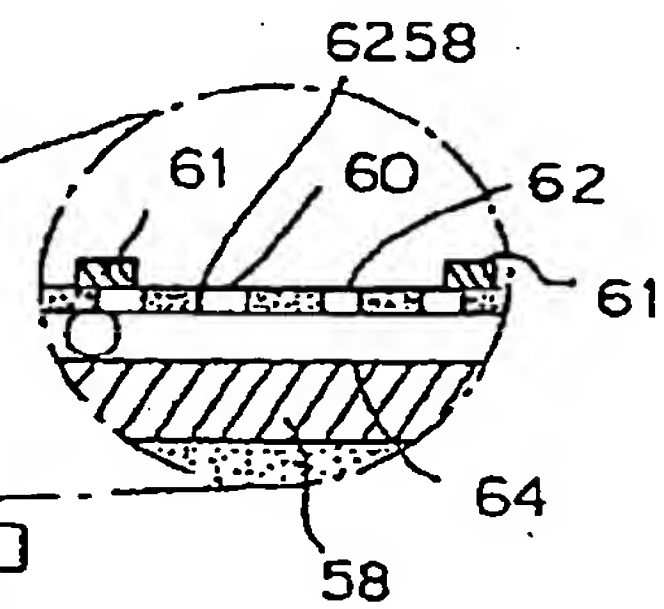
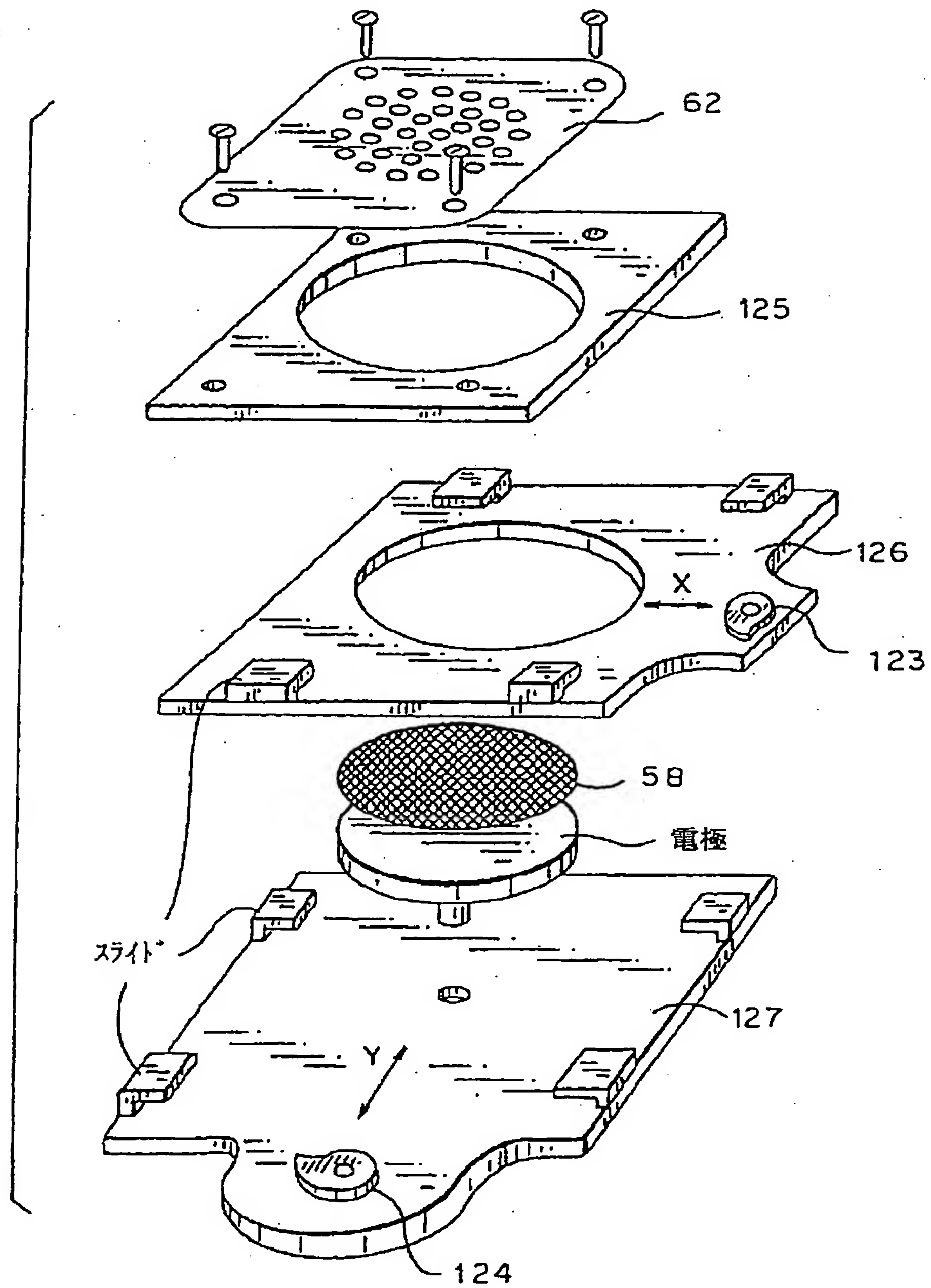


FIG. 32B

マイクロメータ
ヘッド

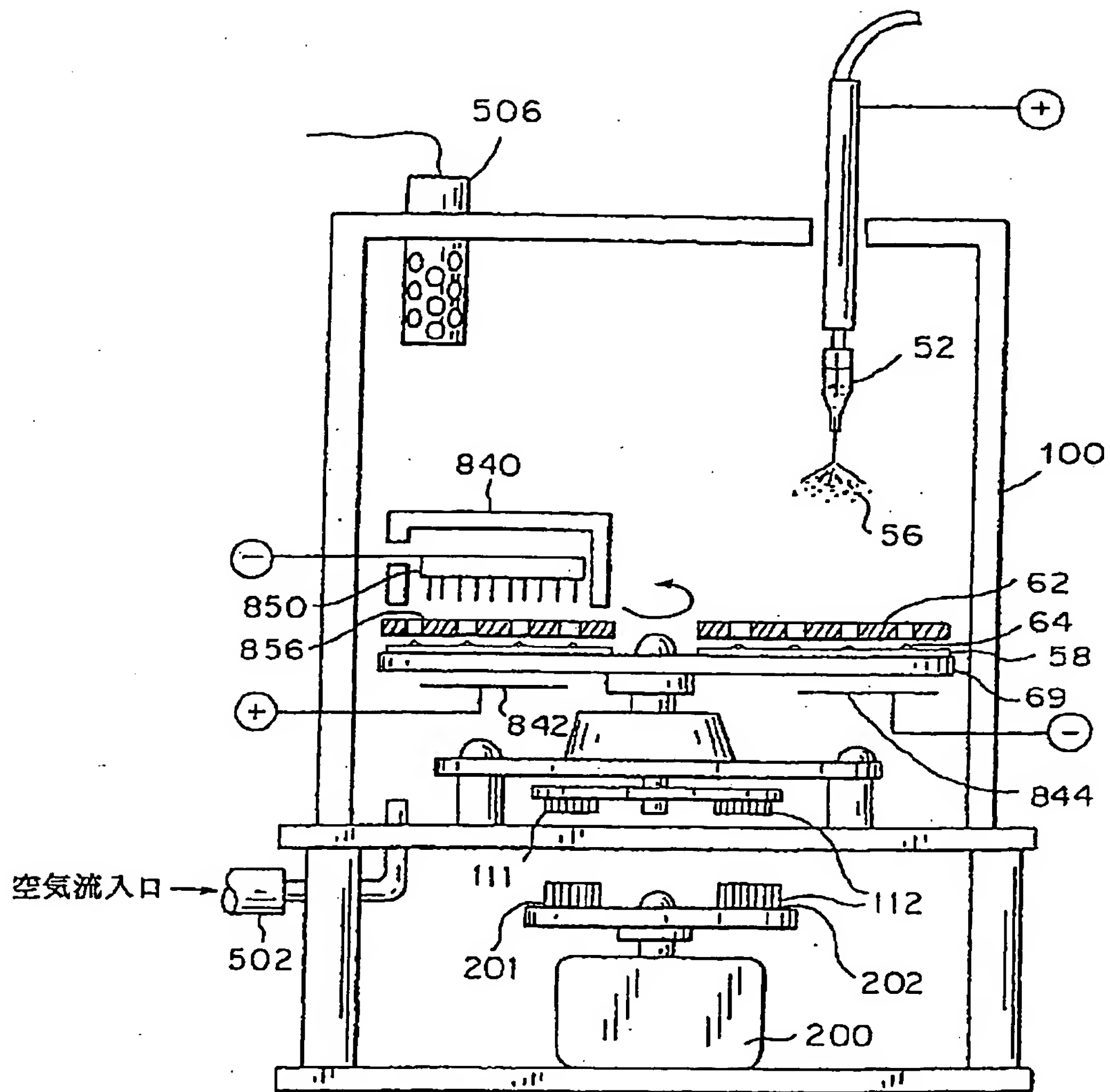
【図33】

FIG. 33



【 図 3 4 】

FIG. 34



[国際調査報告]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US98/12768

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : Please See Extra Sheet. US CL : Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Extra Sheet Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched above + 426/244 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS: electrospray###, chlorostation###, protein, protein like, DNA, amino acids, library###, capillary###, RNA, RNASE, Peroxidase, nucleotide, biochip, biosensor, mask###, spray###		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US A 4,885,076 (SMITH ET AL) 05 December 1989, see: Figures 2, 3, 7, 10, 13, 18, 19, columns 1-2, column 5, line 5-column 12, line 20, examples.	47-70
Y	US A 5,482,867 (BARRETT ET AL) 09 January 1996, Abstract, Figures 4-10; column 2, lines 36-68; column 18, line 25-column 22, line 7.	47-70
X	US, A 4,072,551 (DABAL et al) 07 February 1979, column 7, line 8-column 8, line 45; column 17, line 9-column 18, line 68.	1, 2, 24-28
Y		29-34, 37
X	US, A 4,322,449 (VOSS ET AL) 30 March 1982, see entire document.	1, 2, 24-26
Y		35
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (= specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 SEPTEMBER 1998		Date of mailing of the international search report 13 OCT 1998
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Diana Dudash Telephone No. (703) 308-0661

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
PCT/US98/12768

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US A 5,326,598 (SEAVER ET AL) 05 July 1994, see entire disclosure.	36
A	US, A 4,748,043 (SEAVER et al) 31 May 1988.	1
Y	US, A, 5,543,164 (KROCHTA et al) 06 August 1996 see entire document.	35, 42-44, 25, 27, 28
Y	US, A, 4,464,468 (AVRAMEAS ET AL) 07 August 1984 entire disclosure.	42-43, 12, 25, 27, 28
A	US A 5,279,932 (MIYASAKA ET AL) 18 January 1994	1
A	US A 5,572,023 (CAPRIOLI) 05 November 1996	1
A	US A 5,504,329 (MANN ET AL) 02 April 1996.	1
A	US A 5,481,110 (KRISHNASWAMY ET AL) 02 January 1996	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/12768

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (6)

B05B 5/00, 5/025, 12/00; B05C 5/02; B05D 1/04, 1/06, 1/32, 1/36, 3/00, G01N 21/00, 27/00, 33/50; B01D 59/44

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

250/287, 288; 118/624, 301, 621, 625, 629, 634, 635, 640; 427/2.1, 2.11, 2.12, 458, 338, 353, 377, 466, 472, 475, 483, 272, 282, 414; 435/4.6, 7.1, 7.2, 7.8, 7.92, 174, 175; 436/174, 519

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched

Classification System: U.S.

250/287, 288; 118/624, 301, 621, 625, 629, 634, 635, 640; 427/2.1, 2.11, 2.12, 458, 338, 353, 377, 466, 472, 475, 483, 272, 282, 414; 435/4.6, 7.1, 7.2, 7.8, 7.92, 174, 175; 436/174, 519

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト (参考)
// C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	F
(81) 指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, J P, NZ, US		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.